

Aus dem Institut für Toxikologie und Pharmakologie
der PHILIPPS - Universität in Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. W. KORANSKY

DIE BIOCHEMISCHE UMWANDLUNG VON
HEXACHLORCYCLOHEXAN IN 2,4,6-TRICHLORPHENOL

Inaugural - Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanbiologie des Fachbereiches Humanmedizin
der
PHILIPPS - Universität Marburg

vorgelegt von

Kurt Stein
aus Diez/Lahn

Marburg 1976

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

1977

Aus dem Institut für Toxikologie und Pharmakologie
der PHILIPPS - Universität in Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. W. KORANSKY

DIE BIOCHEMISCHE UMWANDLUNG VON
HEXACHLORCYCLOHEXAN IN 2,4,6-TRICHLORPHENOL

Inaugural - Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanbiologie des Fachbereiches Humanmedizin
der
PHILIPPS - Universität Marburg

vorgelegt von

Kurt Stein
aus Diez/Lahn

Marburg 1976

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der PHILIPPS - Universität Marburg am 17.1.1977
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches
Dekan : Prof. Dr. med. F. Neurath
Referent : Prof. Dr. med. J. Portig
Correferent: Prof. Dr. rer. nat. F. Schneider

<u>INHALTSVERZEICHNIS</u>	Seite
ZUSAMMENFASSUNG	1
EINLEITUNG	4
METHODEN	8
1. Substanzen	8
2. Analytische Verfahren	11
3. Stoffwechseluntersuchungen	14
4. Chemische Experimente	18
ERGEBNISSE	19
1. Versuche an Ratten in vivo	19
1.1. Die initiale Produktion von 2,4,6-Trichlorphenol aus vier Isomeren des Hexachlorcyclohexan .	19
1.2. Produktion von 2,4,6-Trichlorphenol aus beta- und delta-Hexachlorcyclohexan im Verlauf von Tagen	23
1.3. Produktion von 2,4,6-Trichlorphenol aus delta-Pentachlorcyclohexen und 1,3,5-Trichlorbenzol .	23
2. Nichtbiologische Umwandlung von Hexachlorcyclohexan in das symmetrische Trichlorphenol	27
3. Versuche an Mikrosomen der Rattenleber	29
3.1. Bildung von 2,4,6-Trichlorphenol aus delta-Hexachlorcyclohexan	29
3.1.1. Nachweis der Identität des Produkts und Aus- schluß der Bildung anderer Chlorphenole	29
3.1.2. Zeitlicher Verlauf der Bildung des 2,4,6-Tri- chlorphenols an Mikrosomen aus delta-Hexachlor- cyclohexan	32
3.1.3. Belege für die Beteiligung von Cytochrom P-450	32
3.1.4. pH-Abhängigkeit der Reaktion	35

3.1.5. Einfluß von Glutathion	35
3.2. Dehydrochlorierungsprodukte des delta-Hexachlorcyclohexan als Substrate	37
3.3. Produktion von 2,4,6-Trichlorphenol aus anderen Hexachlorcyclohexanisomeren	39
3.4. gamma-Hexachlorcyclohexan als Substrat	40
D I S K U S S I O N	42
1. 2,4,6-Trichlorphenol als Metabolit von Hexachlorcyclohexan in der Ratte	42
2. Die biochemische Umwandlung von Hexachlorcyclohexan zu 2,4,6-Trichlorphenol	42
2.1. Dehydrochlorierung von Hexachlorcyclohexan als initialer Schritt	43
2.2. Einführung von aktiviertem Sauerstoff als initialer Schritt	45
2.3. Der Angriffsort des Sauerstoffs	48
3. Der Abbau des gamma-Hexachlorcyclohexan zu 2,4,6-Trichlorphenol und 2,3,4,6-Tetrachlorphenol	52
LITERATURVERZEICHNIS	53

ZUSAMMENFASSUNG

Säugetiere formen Hexachlorcyclohexan in das symmetrische Trichlorphenol um. Die hier vorgelegte Arbeit setzt sich mit den biochemischen Mechanismen dieser Umformung in Versuchen an Ratten auseinander.

Experimente an lebenden Tieren mit vier Isomeren des Hexachlorcyclohexan bestätigen, daß die Umwandlung in 2,4,6-Trichlorphenol als Teilprozeß der initialen Eliminationsvorgänge quantitative Bedeutung hat. Hinsichtlich der Größe der renalen Ausscheidung von 2,4,6-Trichlorphenol wird folgende Rangordnung der Isomeren festgestellt: $\delta > \gamma \geq \alpha > \beta$. Für δ -Hexachlorcyclohexan wird gezeigt, daß 2,4,6-Trichlorphenol der Hauptmetabolit ist.

2,4,6-Trichlorphenol entsteht, wenn Suspensionen von Lebermikrosomen mit Hexachlorcyclohexan bei Gegenwart von NADPH und molekularem Sauerstoff inkubiert werden. Die Rate der Umformung ist abhängig von der Konfiguration des Hexachlorcyclohexan: $\delta = \epsilon > \alpha \geq \gamma > \beta$.

2,4,6-Trichlorphenol ist das einzige Trichlorphenol, das in Mikrosomensuspensionen nach Inkubation mit Hexachlorcyclohexan gaschromatographisch nachweisbar ist, wenn Hexachlorcyclohexan die Konfiguration α , β , δ oder ϵ hat. Aus γ -Hexachlorcyclohexan entstehen mehrere Chlorphenole, und zwar neben 2,4,6-Trichlorphenol insbesondere ein Tetrachlorphenol. Dieses ist wahrscheinlich das 2,3,4,6-Isomere, das bereits als quantitativ wichtiger Metabolit des γ -Hexachlorcyclohexan in vivo identifiziert worden ist.

Versuche mit mit ^{36}Cl uniform markierter Substanz bestätigen, daß aus δ -Hexachlorcyclohexan 2,4,6-Trichlorphenol als einziges Chlorphenol an Lebermikrosomen gebildet wird. Die

Identität wird durch Massenspektrometrie belegt. Die Umformung von delta-Hexachlorcyclohexan in 2,4,6-Trichlorphenol erfolgt in den ersten Minuten der Inkubation als Reaktion nullter Ordnung, hat ein Optimum um pH 7, und wird durch eine Species des Pigments Cytochrom P-450, die durch Phenobarbital und durch delta-Hexachlorcyclohexan selbst induzierbar sowie durch Metyrapon hemmbar ist, katalysiert.

Zwei Isomere des Pentachlorcyclohexen und die drei Isomere des Trichlorbenzol werden in vitro sowie delta-Pentachlorcyclohexen und 1,3,5-Trichlorbenzol in vivo vergleichend untersucht. Das Resultat der Versuche schließt aus, daß diese Substanzen Zwischenprodukte der Hexachlorcyclohexantransformation zu 2,4,6-Trichlorphenol sind.

Für die biochemische Bildung von 2,4,6-Trichlorphenol aus Hexachlorcyclohexan wird deshalb eine Reaktionssequenz vorgeschlagen, die mit Hydroxylierung von Hexachlorcyclohexan beginnt. Die Sequenz erklärt die exklusive Bildung von 2,4,6-Trichlorphenol. Die Hypothese wird durch chemische Experimente gestützt, aus denen hervorgeht, daß bevorzugt 2,4,6-Trichlorphenol resultiert, wenn Hexachlorcyclohexan durch thermisch aktivierten Sauerstoff angegriffen wird. Es wird außerdem gezeigt, daß die Unterschiede zwischen den Hexachlorcyclohexanisomeren in der Rate ihrer biochemischen Umformung zu 2,4,6-Trichlorphenol den Konfigurationsunterschieden korrelierbar sind, in so weit diese den Grad der sterischen Behinderung für die Annäherung von Sauerstoff an eine Kohlenstoff-Wasserstoff-Bindung bestimmen, während keine Korrelation zu den Unterschieden in der Löslichkeit besteht.

Versuche, die endliche Existenz von Zwischenstufen bei der Bildung von 2,4,6-Trichlorphenol aus delta-Hexachlorcyclohexan an Lebermikrosomen zu demonstrieren, hatten ein negatives

Resultat. Es wird daher vermutet, daß die Intermediärprodukte instabil sind und daß die Einführung von Sauerstoff in Hexachlorcyclohexan der einzige enzymatische Schritt ist.

Es werden außerdem Befunde mitgeteilt, aus denen geschlossen werden kann, daß die Umformung von gamma-Hexachlorcyclohexan zu 2,4,6-Trichlorphenol an Lebermikrosomen weitgehend unabhängig von seiner Umformung zu 2,3,4,6-Tetrachlorphenol sein muß. Andere Autoren haben inzwischen wahrscheinlich gemacht, daß der initiale Schritt auf dem Weg zu Tetrachlorphenol die Dehydrogenierung von gamma-Hexachlorcyclohexan zu Hexachlorcyclohexen, katalysiert durch Cytochrom P-450, ist.

EINLEITUNG

Hexachlorcyclohexan wurde 1825 zum ersten Mal von Michael FARADAY durch Einleiten von Chlor in Benzol im Sonnenlicht dargestellt. Dabei anfallendes Hexachlorcyclohexan besteht aus verschiedenen isomeren Formen, die nach der zeitlichen Reihenfolge ihrer Entdeckung mit fortlaufenden Buchstaben des griechischen Alphabets belegt wurden. Sie unterscheiden sich in ihrer Anordnung der Chlor- bzw. Wasserstoffatome in axialer oder äquatorialer Stellung zum Cyclohexanring. Die Abbildungen 11 und 12 zeigen die Konfigurationen der fünf Isomeren, mit denen in der hier vorgelegten Arbeit experimentiert wurde.

Lediglich das gamma-Isomere, das bei der Produktion aber nur einen Anteil von 10 - 20% hat, besitzt insektizide Wirksamkeit. Durch Verwendung des Rohprodukts gelangten die anderen Isomere (hauptsächlich alpha- und auf Grund seiner hohen Persistenz beta-Hexachlorcyclohexan) ebenfalls in die Umwelt und können heute dort in einem erheblichen Umfang gefunden werden (ABBOTT u.a., 1972; CZEGLEDI-JANKO, 1973). Diese Praxis ist heute in Deutschland eingeschränkt, da hier hauptsächlich das gereinigte gamma-Isomere zur Anwendung kommt. Es ist jedoch von besonderem Interesse, daß inzwischen der Nachweis gelungen ist, daß Mikroorganismen gamma-Hexachlorcyclohexan in das alpha-Isomere umwandeln können (KOSS u.a., in Vorbereitung).

Wegen dieses Sachverhalts interessiert insbesondere die chronische Toxizität von Hexachlorcyclohexanisomeren, d.h. die Frage, ob die chronische Exposition von Mensch und Tier mit diesen Stoffen ein Risiko in sich birgt.

Die Antwort auf diese Frage ist strittig. Auf der Suche nach Kriterien für ihre Beantwortung gibt es mehrere experimentelle Ansatzpunkte. Ein solcher Ansatzpunkt ist die Untersuchung

der biochemischen Reaktionen, die an der Elimination der Substanzen beteiligt sind, weil man auf diese Weise erfährt, welche zellulären Leistungen auf jeden Fall durch die Anwesenheit der Substanzen beansprucht und gegebenenfalls belastet werden.

Die hier vorgelegte Arbeit beschäftigt sich mit einem Teilaspekt der Biotransformation von Hexachlorcyclohexan in Säugetieren. Auf früheren Erkenntnissen aufbauend ist ihr Ziel die Analyse des biochemischen Mechanismus der Umwandlung von Hexachlorcyclohexan in das symmetrische Trichlorphenol (2,4,6-TCP). 2,4,6-Trichlorphenol wurde zuerst im Urin von Ratten, die mit alpha-Hexachlorcyclohexan vergiftet worden waren, nachgewiesen (KORANSKY und PORTIG, 1962). FREAL und CHADWICK (1973) bestätigten diesen Befund und fanden, daß 2,4,6-Trichlorphenol auch nach Applikation der Isomeren beta, gamma und delta an Ratten im Urin auftritt. In Kaninchen (KARAPALLY u.a., 1973) und in Mäusen (KURIHARA u.a., 1974) werden gamma- bzw. gamma- und beta-Hexachlorcyclohexan ebenfalls in 2,4,6-Trichlorphenol umgeformt. KORANSKY u.a. (1975) stellten in Versuchen an Ratten fest, daß nach Applikation von alpha-Hexachlorcyclohexan die im Verlauf von 4 Halbwertszeiten mit dem Urin ausgeschiedene Menge 2,4,6-Trichlorphenol knapp 30% der Dosis und etwa 45% aller renal eliminierten Metabolite betrug. Daraus ging hervor, daß die Umformung zum symmetrischen Trichlorphenol entscheidend zur Elimination dieses Isomeren beiträgt.

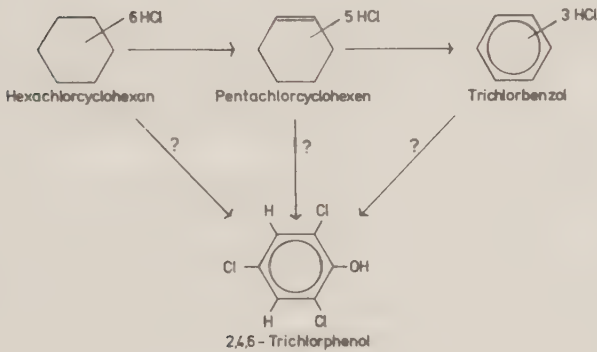
Die Vorstellungen von der Biotransformation des Hexachlorcyclohexan zu Chlorphenolen im Säugetier, die zu Beginn dieser Arbeit existierten, wurden bestimmt durch eine zuerst von GROVER und SIMS (1965) formulierte Hypothese. GROVER und SIMS (1965) haben Ratten gamma-Hexachlorcyclohexan und sein trans-1:2-Monodehydrochlorierungsprodukt, gamma-1,3,4,5,6-Penta-

chlorcyclohex-1-en, appliziert und im Urin der Tiere als Metaboliten beider Substanzen die Schwefelsäure- und Glucuronsäurekonjugate der Trichlorphenolisomeren 2,4,5- und 2,3,5- identifiziert. Sie fanden weder bei Hexachlorcyclohexan noch bei Pentachlorcyclohexen 2,4,6-Trichlorphenol und schlossen aus ihrem Befund, daß die Biotransformation von Hexachlorcyclohexan mit Dehydrochlorierung zum Pentachlorcyclohexen beginnt, das seinerseits weiter zu Trichlorbenzol dehydrochloriert wird. Insbesondere nahmen GROVER und SIMS (1965) an, daß analog zur basisch katalysierten Dehydrochlorierung des Hexachlorcyclohexan im Reagenzglas (VAN DER LINDEN, 1912) auch in vivo Überwiegend 1,2,4-Trichlorbenzol entsteht, denn es war bekannt (JONDORF u.a., 1955), daß dieses Trichlorbenzol im Kaninchen zu 2,4,5- und 2,3,5-Trichlorphenol oxidiert wird.

FREAL und CHADWICK (1973) fanden in Benzolextrakten aus dem Urin Hexachlorcyclohexan-behandelter Ratten mehr 2,4,6- als 2,4,5-/2,3,5-Trichlorphenol und nach gamma-Pentachlorcyclohexen gar kein symmetrisches Trichlorphenol. Sie korrigierten den von GROVER und SIMS (1965) vorgeschlagenen Weg durch die Annahme, daß Hexachlorcyclohexan im Tier zu mehreren Pentachlorcyclohexenisomeren dehydrochloriert wird, von denen eines bei weiterer Dehydrochlorierung Überwiegend oder ausschließlich in das symmetrische Trichlorbenzol übergeht, dessen biologische Oxidation zu 2,4,6-Trichlorphenol beschrieben worden ist (JONDORF u.a., 1955; PARKE und WILLIAMS, 1960). Die hier vorgelegte Arbeit ging davon aus (vgl. Abb. 1), daß die bisher erarbeiteten Kenntnisse über die biochemische Transformation von Hexachlorcyclohexan zu 2,4,6-Trichlorphenol neben der Oxidation von Trichlorbenzol zwei weitere Möglichkeiten für die Einführung des Sauerstoffs in das Molekül

noch nicht prinzipiell ausschließen: die Oxidation von Pentachlorcyclohexen (mit Ausnahme des gamma-Isomeren) und die Oxidation von Hexachlorcyclohexan selbst.

Abbildung 1: Mögliche Abbauewege von Hexachlorcyclohexan zu 2,4,6-Trichlorphenol



METHODEN

1. Substanzen

1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan

Alpha-, beta-, gamma- und delta-Hexachlorcyclohexan wurden von Ferak, Berlin, erhalten und aus konzentrierter Salpetersäure oder Isopropanol umkristallisiert. Die gaschromatographische Reinheit (Flammenionisationsdetektor) lag über 99%.

Epsilon-Hexachlorcyclohexan wurde aus technischem Hexachlorcyclohexan, das nur noch wenig des gamma-Isomeren enthielt (Merck, Darmstadt), isoliert. Der Gehalt an epsilon-Hexachlorcyclohexan betrug 0,2%. Die Isolierung erfolgte unter gaschromatographischer Kontrolle.

Durch Auskochen von 200 Gramm des Gemisches mit 2 mal 100 ml Aceton und schrittweises Einengen des Extraktes auf 10 ml wurde ein Großteil des alpha- und des beta-Isomeren durch Fällung abgetrennt. Die Überstehende Lösung wurde zur Trockne eingedampft und in Äthanol aufgenommen. Einengen der äthanolischen Lösung auf 10 ml steigerte den Anteil des epsilon-Hexachlorcyclohexan an den gelösten Substanzen auf 5%. Nach Abziehen des Äthanol wurde der trockne Rückstand in Hexan, gesättigt mit Nitromethan, aufgenommen, um die Isomeren alpha und gamma auf einer Kieselgelsäule (60 cm x 3,5 cm), belegt mit Nitromethan (360 g Kieselgel zur Chromatographie und 180 g Nitromethan), nach dem Verfahren von RAMSEY und PATTERSON (1946) vollständig abzutrennen. Durch Waschen des Kieselgels mit Aceton konnte eine Lösung erhalten werden, die nur noch beta-, delta- und epsilon-Hexachlorcyclohexan enthielt. Diese Lösung wurde zur Trockne eingedampft und der Rückstand in Hexan, gesättigt mit 80%igem, wäßrigem Methanol, aufgenommen. Auf einer zweiten Kieselgelsäule, die mit 80%igem, wäßrigem Methanol (360 g Kieselgel und 180 g 80%iges, wäßriges Methanol) belegt war, wurde aus dieser Lösung das beta-Isomere abgetrennt. Das Eluat enthielt ein Gemisch von delta- und epsilon-Hexachlorcyclohexan, aus dem durch fünfmaliges Umkristallisieren aus Hexan 140 mg epsilon-Hexachlorcyclohexan gewonnen wurde. Schmelzpunkt: 216°C (nach LA CLAIR (1948) 218,5 - 219,3°C)
Reinheit : 99,7% (gaschromatographisch, Flammenionisationsdetektor)

Die relative Retentionszeit stimmte mit der von STIJVE und CARDINALE (1972) für OV-17 angegebenen überein. Das Massenspektrum zeigte die typischen Zerfallsprodukte eines Hexachlorcyclohexanmoleküls.

³⁶Cl-Hexachlorcyclohexan war von Dr. P. E. Schulze (Schering AG, Berlin) durch Chlorieren von Benzol synthetisiert worden und hatte eine spezifische Aktivität von 1,3 Ci/Mol. Das delta-Isomere war durch Dünnschichtchromatographie abgetrennt worden (GRUNDEY und KRAUS, 1976). Es hatte eine Reinheit von über 99% (gaschromatographisch, Elektroneneinfangdetektor). Die Substanz wurde mit ^{35,37}Cl-delta-Hexachlorcyclohexan auf eine spezifische Aktivität von 580.000 Zpm/ μ Mol verdünnt.

1,3,4,5,6-Pentachlorcyclohex-1-en

Gamma- und delta-Pentachlorcyclohexen wurden durch Monohydrochlorierung der entsprechenden Hexachlorcyclohexan-isomeren in Dimethylformamid mit Natriumacetat unter Rühren bei Raumtemperatur hergestellt.

Einwaage: 10 g Hexachlorcyclohexan in 25 ml Dimethylformamid und Zusatz von 10 g Natriumacetat.

delta-Isomeres:

Bei einem gaschromatographisch bestimmten Verhältnis Pentachlorcyclohexen zu Hexachlorcyclohexan von 10 zu 1 wurde der Ansatz mit Wasser versetzt und mit Hexan extrahiert. Der Hexanextrakt wurde zur Trockne eingengt und anschließend der Rückstand zweimal aus Isopropanol umkristallisiert.

Ausbeute : 5,4 g $\hat{=}$ 60% der Theorie

Schmelzpunkt: 68,1°C ; nach KOLKA u.a. (1954) 68,2 - 68,6°C

Reinheit : 99,7% (gaschromatographisch, Flammenionisationsdetektor)

gamma-Isomeres:

Bei einem Verhältnis Pentachlorcyclohexen zu Hexachlorcyclohexan von 1 zu 1 wurde wie für das delta-Isomere verfahren. Die Hexanphase wurde jedoch nur auf 10 ml eingengt und 12 Stunden bei -18°C aufbewahrt. Dabei fiel der größte Teil des Hexachlorcyclohexan aus. Der Überstand wurde anschließend eingengt und in einer Feindestillationsapparatur destilliert. Das Destillat bei 123°C/11 Torr wurde aufgefangen. Es enthielt 3,5 g gamma-Pentachlorcyclohexen (40% der Theorie) mit einer

gaschromatographischen Reinheit von 97,3%. Die Verunreinigungen waren 0,2% gamma-Hexachlorcyclohexan, 2,2% 1,2,4-Trichlorbenzol und 0,3% 1,3,5- und 1,2,3-Trichlorbenzol. Eine kleine Menge des Destillats wurde anschließend auf einer Kieselgelsäule (30 cm x 0,8 cm; 18 g Kieselgel und 9 g Nitromethan) nach dem Verfahren von RAMSEY und PATTERSON (1946) gereinigt. Dabei wurden 99,9% reines gamma-Pentachlorcyclohexen erhalten. Nach Aufbewahren der öligen Flüssigkeit bei -18°C für eine Woche erstarrte die Substanz mit einem Schmelzpunkt von $36,5^{\circ}\text{C}$. Dies bestätigte die Angabe von FRICKE (1956), der einen Schmelzpunkt von $36,5 - 36,8^{\circ}\text{C}$ festgestellt hatte. Durch Übertragen einer kleinen Menge Festsubstanz konnte das Destillat ebenfalls zum Erstarren gebracht werden. Der Schmelzpunkt betrug hier $34 - 35^{\circ}\text{C}$.

1,1,2,3,4,5,6-Heptachlorcyclohexan

alpha-Heptachlorcyclohexan wurde nach RIEMSCHEIDER (1951, 1953) durch Chlorieren von delta-Pentachlorcyclohexen hergestellt.

delta-Pentachlorcyclohexen wurde in Tetrachlorkohlenstoff gelöst und 6 Stunden bei 50°C mit Chlorgas (aus Natriumchlorid, Mangandioxid und konzentrierter Schwefelsäure) durchperlt. Nach Abziehen des Lösungsmittels entstand ein Kristallbrei, der in Hexan gelöst wurde und nach dem Verfahren von RAMSEY und PATTERSON (1946) getrennt wurde. Dabei konnte alpha-Heptachlorcyclohexan von drei anderen entstandenen Produkten (wahrscheinlich gamma-Heptachlorcyclohexan, beta-Oktachlorcyclohexan und ein weiteres Oktachlorcyclohexan) abgetrennt werden.

Schmelzpunkt: $151,5 - 152^{\circ}\text{C}$ (nach RIEMSCHEIDER (1953) 152°C)
Reinheit : Über 99% (gaschromatographisch, Flammenionisationsdetektor)

Das Massenspektrum enthielt kein Molekülion, aber Signale bei m/e : 287 ($M^{+} - \text{Cl}$; 1%), 252 ($M^{+} - 2\text{Cl}$; 4,6%), 251 ($M^{+} - \text{Cl} - \text{HCl}$; 61,7%), 216 ($M^{+} - 2\text{Cl} - \text{HCl}$; 2,5%) und 215 ($M^{+} - \text{Cl} - 2\text{HCl}$; 28,2%).

Es trat eine Gruppierung bei 83 (9,5%), 85, 87 auf , die die geminale Chlorgruppierung CHCl_2^{+} anzeigt (SEIBL, 1970). Außerdem entstand aus der Substanz bei partieller Zersetzung in 0,1N-NaOH ein Hexachlorcyclohexen mit m/e : 286 (M^{+} ; 15,4%), 251 ($M^{+} - \text{Cl}$; 23,4%) und 215 ($M^{+} - \text{Cl} - \text{HCl}$; 80,6%) und Tetrachlorbenzole mit m/e : 214 (M^{+} ; 78%)

2,4,6-Trichlorphenol und 2,3,4,6-Tetrachlorphenol wurden bei Fluka, Buchs, Schweiz bezogen und hatten nach Umkristalli-

sieren eine Reinheit von über 99%. Andere Chlorphenole und die isomeren Trichlorbenzole wurden ebenfalls von Fluka erhalten und, sofern sie verunreinigt waren, umkristallisiert. Isomere Dichlorthiophenole waren durch Hydrolyse der isomeren Dichlorphenylcysteine hergestellt worden (SODOMANN, 1975). NADP als Dinatrium, NADPH als Tetranatriumsalz und Isocitratdehydrogenase wurden bei Boehringer, Mannheim, gekauft; D,L-Isocitronensäure als Trinatriumsalz (mit 3 Mol Wasser) bei Sigma Chemicals.

Metirapon wurde bei Aldrich Chemicals, 3-Methylcholanthren bei Sigma Chemicals bezogen.

Gase: Stickstoff reinst, Sauerstoff reinst, Argon reinst mit 10% Methan, Helium 99,995% und Kohlenmonoxid 99,997% wurden von Messer, Griesheim, bezogen.

Diazomethan wurde nach dem Verfahren von DE BOER und BACKER (1956) hergestellt.

Alle übrigen Verbindungen und Lösungsmittel waren analysenrein und wurden bei Merck, Darmstadt, bezogen.

2. Analytische Verfahren

Gaschromatographische Untersuchungen wurden an Hewlett Packard Research Chromatographen Modell 5750 mit Flammenionisationsdetektor und 5700A mit Elektroneneinfangdetektor (^{63}Ni ; Typ HP 18713A) durchgeführt. Als Trägergas diente bei dem Modell 5750 Stickstoff und bei dem Modell 5700A Argon/Methan. Die Temperatur der Detektoren lag bei 300°C , der Einspritzblöcke bei 200 oder 250°C . Der Ofen wurde isotherm beheizt. Quantifizierung erfolgte durch Peakhöhenvergleich. Als Trennsäulen wurden gepackte Glassäulen mit einem inneren Durchmesser von 2,5mm und einer Länge von 180cm benutzt.

Tabelle 1: Relative Retentionszeiten von Chlorphenolen als Methyläther auf OV 1 und relative Peakhöhen bei Detektion mittels Elektroneneinfang.

140°C			170°C		
rel.RT		rel.Peakhöhe	rel.RT		rel.Peakhöhe
Dichlorphenole			Tri- und Tetrachlorphenole		
2,6	0,61	0,093	2,4,6	1,0	1,0
3,5	0,66	0,040	2,3,6	1,11	0,83
2,5	0,72	0,028	2,4,5	1,34	0,25
2,4	0,77	0,035	2,3,5	1,36 ¹	0,28
3,4	0,81	0,017	3,4,5	1,43	0,16
2,3	0,93	0,033	2,3,4	1,60	0,19
2,4,6	1,0	1,0	2,3,5,6	1,78	0,9
			2,3,4,6	1,79 ²	1,1
			2,3,4,5	2,67	0,14

¹ nicht getrennt von 2,4,5-Trichlorphenol

² nicht getrennt von 2,3,5,6-Tetrachlorphenol

Die Retentionszeit des 2,4,6-Trichlorphenol betrug bei einem Gasstrom von 30 ml/min 6 Minuten 12 Sekunden bei 140°C und 3 Minuten 8 Sekunden bei 170°C.

Im Text und in den Zeichnungen wird zur Vereinfachung der Darstellung die Bezeichnung Phenol und nicht Anisol oder Phenol-methyläther benutzt.

- a) zur Trennung von Chlorphenolen als Methyläther (Anisole):
OV 1 (3%) auf Gaschrom Q, 100 - 120 mesh (s. Tabelle 1).
Diese Säule wurde auch zur Kontrolle der Reinigung von alpha-Heptachlorcyclohexan benutzt.
- b) zur Trennung von isomeren Hexachlorcyclohexanen, Pentachlorcyclohexenen und Trichlorbenzolen (STIJVE und CARDINALE, 1972):
OV 17 (3%) auf Gaschrom Q, 100 - 120 mesh.
- c) zur Trennung von Dichlorthiophenolen als Methyläther (SODOMANN, 1975):
DEGS (15%) auf Gaschrom P, 100 - 120 mesh.

Massenspektren wurden an einem LKB Modell 2091 Sektorfeldgerät mit Elektronenstoßionisation registriert. Die Eingabe der Substanzen erfolgte über einen Pye-Unicam Gaschromatographen, in dem eine 240 cm x 1,5 mm Glassäule, gepackt mit QF-1 (3%), installiert war, und einen 2-Stufen-Jet-Separator. Die Trennung der Extraktkomponenten durch die Chromatographie-säule wurde jeweils zuvor am HP-Chromatographen Modell 5700A geprüft. Die Ionenquelle wurde auf 270°C gehalten. Die Elektronenenergie betrug 70 eV, die Scangeschwindigkeit 5 Sekunden für die Massen 0 bis 500. Die Scandaten wurden in einem pdp-11 Rechner gespeichert und mit einem Programm des Herstellers analysiert.

Absorptionsmessungen wurden am Spektralphotometer DMR-21 von Zeiss durchgeführt.

Zur Fraktionierung von Organhomogenaten wurden eine Kühlzentrifuge Sorvall RC 2-B und eine Beckman Spinco L2-65B Ultrazentrifuge mit einem Festwinkelrotor 65Ti benutzt.

Die Messung von ^{36}Cl wurde mit einem Flüssigkeitsszintillationszähler Modell Tricarb, Serie 3000, der Firma Packard Instruments durchgeführt. Als Szintillatoren wurden PPO und Dimethyl-POPOP, gelöst in einem Gemisch aus Triton X-100 und Toluol (1 + 2), benutzt. Der Zählfehler wurde bestimmt durch Zusatz von ^{36}Cl -Hexachlorbenzol bekannter spezifischer Aktivität (Amersham-Buchler).

pH-Werte wurden mit einem Präzisions-pH-Meter der Firma Metrohm AG, Herisau, Schweiz, gemessen.

Schmelzpunkte wurden mit einem Schmelzpunktmikroskop der Firma Leitz, Wetzlar, bestimmt.

Dünnschichtchromatographie wurde auf 20 x 20 cm Glasplatten mit einer selbstgezogenen Schicht von 0,2 mm Kieselgel GF₂₅₄ durchgeführt. Ihr Zweck war die qualitative Orientierung über die Zusammensetzung von Urinextrakten. Zur Trennung

von Chlorphenolen und Chlorthiophenolen wurde mit Benzol über eine Laufstrecke von 15 cm entwickelt. Die Substanzen wurden an Hand ihrer Fluoreszenzlöschung im aufscheinenden UV-Licht lokalisiert. Dichlorthiophenole hatten unter diesen Bedingungen rF-Werte um 0,9, die oben (Tab. 1) genannten Chlorphenole hatten rF-Werte von $\leq 0,5$.

3. Stoffwechseluntersuchungen

Als Versuchstiere dienten Ratten eines Wistar-Stammes aus dem Zentralinstitut für Versuchstiere, Hannover. Sie erhielten Altromin R-10 Preßfutter und Wasser ad libitum.

Die Applikation von Substanzen erfolgte durch intraperitoneale Injektion morgens zwischen 9 und 10 Uhr. Chlorkohlenwasserstoffe wurden als Lösungen in Olivenöl appliziert. Das Injektionsvolumen betrug maximal 2 ml. Lediglich zur Lösung von 173 μMol beta-Hexachlorcyclohexan mußte das Volumen auf 5 ml erhöht werden. 3-Methylcholanthren wurde ebenfalls in Olivenöl gelöst. Die Dosis betrug 20 mg/kg. Die Tiere wurden 24 Stunden später dekapitiert.

Phenobarbital-Natrium wurde in 1 ml Wasser appliziert und zwar je 100 mg/kg an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Die Tiere wurden 24 Stunden nach der letzten Dosis dekapitiert. Kontrolltiere erhielten das entsprechende Volumen Olivenöl bzw. 3 mal 1 ml einer äquimolaren Kochsalzlösung.

Zur getrennten Gewinnung von Urin und Stuhl wurden die Tiere einzeln in Stoffwechselkäfigen gehalten. In den Käfigen wurden 75% des produzierten Urins in einem auf -6°C gekühlten Gefäß aufgefangen (NOACK u.a., 1975). Urin und Stuhl wurden in Abständen von 24 Stunden gesammelt und bei -18°C aufbewahrt.

Nachweis von Hexachlorcyclohexan und 2,4,6-Trichlorphenol im Stuhl

Der Stuhl eines Tages wurde mit getrocknetem Natriumsulfat zu einem Pulver verrieben und 24 Stunden mit 150 ml Dioxan in einer Soxhlet-Apparatur extrahiert. Der Extrakt konnte direkt für die gaschromatographische Analyse verwendet werden.

Zum Nachweis von 2,4,6-Trichlorphenol wurden 50 ml des Dioxan-extrakts mit 5 ml 0,1N-NaOH versetzt und zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 5 ml Wasser aufgenommen, einmal mit Hexan gewaschen, mit Salzsäure angesäuert und in 5 ml Hexan extrahiert.

1 ml des Hexanextrakts wurde abgenommen, mit 1 ml Diazomethanolösung versetzt und gaschromatographisch untersucht.

Nachweis von 2,4,6-Trichlorphenol im Urin

Der Urin eines Tages wurde mit 10N-NaOH auf 2N eingestellt und 3 Stunden bei 100°C am Rückfluß hydrolysiert. Anschließend wurde mit Salzsäure angesäuert und in 5 ml Hexan extrahiert. 1 ml der Hexanphase wurde abgenommen, mit 1 ml Diazomethanolösung versetzt und frühestens nach 12 Stunden gaschromatographisch untersucht.

Nach Zugabe von 2,4,6-Trichlorphenol zu dem Urin betrug die Wiederfindungsquote 98 - 102%. Die biologische Wiederfindung wurde ebenfalls geprüft. Nach intraperitonealer Applikation von 25 µMol 2,4,6-Trichlorphenol wurden im Urin des ersten Tages 17,8 µMol wiedergefunden, das sind unter Berücksichtigung des Verlustes an Urin im Käfig (s.o.) 95% der Dosis.

Präparation von Lebermikrosomen

Die Tiere wurden morgens zwischen 9 und 10 Uhr dekapitiert. Nach Entbluten des Rumpfes wurde die Leber entnommen und gewogen. Mit Hilfe eines Potter-Elvehjem-Gerätes wurden je

2 g Leber in 10 ml Saccharoselösung, gepuffert mit Tris auf pH 7,4, homogenisiert. Das Homogenat wurde 10 Minuten bei 12.000 g zentrifugiert. Die Lipidschicht wurde abgesaugt und der Überstand 60 Minuten bei 100.000 g zentrifugiert. Die Mikrosomen aus 2 g Leber wurden anschließend in 10 ml einer Lösung von 0,15 M Saccharose, 0,025 M Kaliumchlorid und 0,01 M Magnesiumsulfat resuspendiert. Alle Arbeitsvorgänge erfolgten zwischen +2 und +5°C.

Inkubation der Mikrosomen erfolgte in 25 ml-Erlenmeyergläsern in einem Wasserbad von 37°C. Zur besseren Durchmischung wurde 100 mal pro Minute horizontal geschüttelt.

Der Standardansatz enthielt Mikrosomen aus 1 g Leber in einem Endvolumen von 7 ml mit 0,02 M Phosphatpuffer, 10 µMol NADP, 64 µMol D,L-Isocitrat, 50 µg Isocitratdehydrogenase und 1 µMol Hexachlorcyclohexan, zugegeben in 3 µl Methanol. Die Reaktion wurde gestartet nach 2 Minuten Vorinkubation durch Zusatz des NADP und des Isocitrat in 1 ml Wasser, eingestellt auf den gewünschten pH mit Kaliumdihydrogenphosphat oder Dinatriumhydrogenphosphat. Standardinkubationsdauer war 15 Minuten. Beta-Hexachlorcyclohexan wurde in Dioxan gelöst zugegeben, andere Chlorkohlenwasserstoffe gelöst in Methanol, maximal 3 µl pro Ansatz. Die Rate der Bildung von 2,4,6-Trichlorphenol aus delta-Hexachlorcyclohexan war in Gegenwart von 3 µl Dioxan die gleiche wie in Gegenwart von 3 µl Methanol. Zusatz von Metyrapon erfolgte als wäßrige Lösung.

Zum Austausch der Gasphase wurden die Gefäße zehnmal langsam evakuiert und mit dem gewünschten Gas oder Gasgemisch wieder aufgefüllt. Die Reaktion wurde gestartet durch Zugabe von Hexachlorcyclohexan und von NADP und Isocitrat, deren Lösung unter Stickstoff gehalten wurde. Während der Inkubation wurde das gewünschte Gas oder Gasgemisch über das Inkubat

geleitet. Um Reduktion der enzymatischen Aktivität durch die mechanische Beanspruchung der Mikrosomen zu kontrollieren, wurden Parallelansätze mit Luft wiederaufgefüllt.

Ansätze für die Inkubation in Gegenwart von Kohlenmonoxid waren folgendermaßen zusammengesetzt:

Mikrosomen aus 100 mg Leber in einem Endvolumen von 3 ml,
1 μ Mol NADP, 6,4 μ Mol Isocitrat, 5 μ g Isocitratdehydrogenase,
170 nMol delta-Hexachlorcyclohexan in 1 μ l Methanol.

Zwei verschiedene Gasgemische wurden hergestellt:

Sauerstoff + Kohlenmonoxid + Stickstoff = 2 + 4 + 4

Sauerstoff + Kohlenmonoxid = 2 + 8

Zur Kontrolle der experimentellen Bedingungen wurden zwei bekannte Reaktionen geprüft. Die Amidopyrindemethylierung wurde in Gegenwart von Sauerstoff und Kohlenmonoxid im Verhältnis von 1 + 2 und 1 + 4 auf 57,5% und auf 43% gesenkt. Die Demethylierung von Äthylmorphin, für die ESTABROOK u.a. (1970) einen Warburgkoeffizienten von 1,3 angeben, wurde bei einem CO/O_2 -Verhältnis von 2/1 auf 37% gesenkt.

Isolierung von Chlorphenolen

Die Reaktion wurde durch Überführen des Inkubats in ein Rundbodenglas, das 1 ml Salzsäure (konz.) und 5 ml Hexan enthielt, gestoppt. Nach 30 Minuten Extraktion wurde kurz zentrifugiert und 4,5 ml der Hexanphase abgenommen. Die Hexanphase wurde mit 3 ml 0,1 N NaOH unterschichtet und 30 Minuten extrahiert. Nach Zentrifugieren wurde das Hexan mittels einer Kapillare abgezogen und die Natronlauge mit 2 ml Hexan gewaschen. Anschließend wurde mit Salzsäure angesäuert und in 2 ml Hexan extrahiert. 1,5 ml der Hexanphase wurden abgenommen, mit 0,5 ml Diazomethanlösung versetzt und gaschromatographisch untersucht. Die Wiederfindung nach Einpipettieren von 0,5 μ Mol 2,4,6-Trichlorphenol oder 2,3,4,6-Tetrachlorphenol zu den nativen Mikrosomen betrug 98%.

4. Chemische Experimente

Überprüfung des Resultats von MEUNIER

4 mg Hexachlorcyclohexan wurden mit 3 ml Wasser in einem Bombenrohr von 5 - 6 ml Inhalt eingeschmolzen und 4 Stunden auf 200°C erhitzt. Austausch der Gasphase erfolgte durch zehnmaliges Evakuieren des Ansatzes und Wiederauffüllen mit dem gewünschten Gas. Zur Identifizierung der Umsetzungsprodukte wurde der Ansatz mit 5 ml Hexan extrahiert.

Dieser Extrakt wurde auf seinen Gehalt an nicht umgesetztem Hexachlorcyclohexan, an Pentachlorcyclohexen und an Trichlorbenzolen untersucht. Ein aliquoter Teil wurde mit 0,1 N-NaOH extrahiert. Die Natronlauge wurde einmal mit Hexan gewaschen und nach Ansäuern in Hexan extrahiert. Nach Umsetzung mit Diazomethan wurde dieser Extrakt auf seinen Gehalt an Chlorphenolen untersucht.

Zur Verseifung von alpha-Heptachlorcyclohexan wurden 30 mg der Substanz mit 30 ml 0,1 N-HCl in einem Bombenrohr 4 Stunden auf 200°C erhitzt. Eine Hälfte des Reaktionsgemisches wurde mit 20 ml Hexan extrahiert und der Extrakt auf seinen Gehalt an Chlorphenolen untersucht. Die andere Hälfte des Ansatzes wurde, vor der sauren Extraktion mit Hexan, 1 N an NaOH gemacht und 1 Stunde am Rückfluß gekocht. Dieses Vorgehen diente zur Prüfung auf die Anwesenheit nicht aromatischer Zwischenprodukte, die in Gegenwart von Alkali umgeformt wurden.

ERGEBNISSE

1. Versuche an Ratten in vivo

1.1. Die initiale Produktion von 2,4,6-Trichlorphenol aus vier Isomeren des Hexachlorcyclohexan

Vier weibliche Ratten gleichen Körpergewichts erhielten durch intraperitoneale Injektion eine Dosis von 17,3 μMol ($\approx 30 \text{ mg/kg}$) der Hexachlorcyclohexanisomeren alpha-, beta-, gamma- und delta-. Ihr Urin wurde über drei Tage gesammelt und auf seinen Gehalt an 2,4,6-Trichlorphenol untersucht. Das Resultat, zusammengefaßt in Tabelle 2, bestätigte den Befund von FREAL und CHADWICK (1973), daß Ratten alle vier Hexachlorcyclohexanisomere in das symmetrische Trichlorphenol umformen. Die Isomere unterscheiden sich in der initial produzierten Menge des Phenols nach der Rangordnung $\text{delta} > \text{gamma} \approx \text{alpha} > \text{beta}$.

Tabelle 2: Initiale renale Ausscheidung von 2,4,6-Trichlorphenol nach intraperitonealer Injektion von Hexachlorcyclohexanisomeren

Hexachlorcyclohexaniso- mer appliziert (17,3 μMol)	2,4,6-Trichlorphenol aus- geschieden in 3 Tagen (μMol)
alpha	1,72
beta	0,16
gamma	1,89
delta	7,5

Die gaschromatographische Analyse der Extrakte, die aus den Urinproben zur Bestimmung ihres Gehaltes an 2,4,6-Trichlor-

phenol hergestellt wurden, ergab, daß bei Detektion mittels Elektroneneinfang außer dem symmetrischen Trichlorphenol weitere Substanz-Peaks registriert wurden, die in Extrakten aus Kontrollurin nicht enthalten waren und deren Retentionszeiten mit denen anderer Chlorphenole oder Chlorthiophenole übereinstimmten. Die Anwesenheit von Chlorthiophenolen wurde auch dünnschichtchromatographisch nachgewiesen (vgl. Abb. 2c). Die Menge dieser anderen Metabolite wurde nicht bestimmt. Kein Signal war jedoch größer als das des 2,4,6-Trichlorphenol. Dies war auch dann nicht der Fall (vgl. Abb. 1a-c), wenn statt eines Elektroneneinfang- ein Flammenionisationsdetektor benutzt wurde. Die Abbildungen 1a-c zeigen das so erhaltene "Muster" der Metaboliten von alpha-, gamma- und delta-Hexachlorcyclohexan. Die Menge Substanz, die in Extrakten aus Urin nach Gabe von beta-Hexachlorcyclohexan enthalten war, war zu klein, um von einem Flammenionisationsdetektor erfaßt zu werden. Der Elektroneneinfangdetektor registrierte eine Zusammensetzung, die der nach alpha- und delta-Hexachlorcyclohexan ähnlich war.

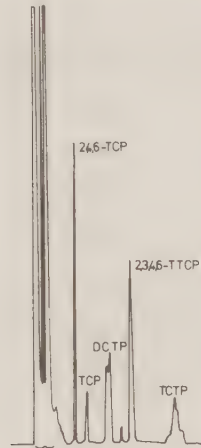
Gamma-Hexachlorcyclohexan unterschied sich von seinen hier untersuchten Konfigurationsisomeren durch das Auftreten erheblich größerer Mengen anderer Metabolite neben 2,4,6-Trichlorphenol, insbesondere von Tetrachlorphenol und Trichlorthiophenolen (PORTIG u.a., unveröffentlicht). KORANSKY und Mitarbeiter (1964) haben 2,3,4,6-Tetrachlorphenol im Urin von mit gamma-Hexachlorcyclohexan-vergifteten Ratten durch Isotopenverdünnungsanalyse nachgewiesen. CHADWICK und FREAL (1972) fanden 2,3,4,5-Tetrachlorphenol neben dem 2,3,4,6-Isomeren, aber kein 2,3,5,6-Tetrachlorphenol als renale Ausscheidungsprodukte von gamma-Hexachlorcyclohexan.

Abbildung 1: Hexachlorcyclohexanmetaboliten im Rattenurin

a)



b)



c)



Gaschromatogramme von Hexanextrakten aus alkalisch hydrolysiertem Urin (s. Methoden) nach Umsetzung mit Diazomethan nach Gabe von: a) alpha-
b) gamma-
c) delta-

Hexachlorcyclohexan.

GC-Bedingungen: Detektor FID
gepackte Glassäule OV 1, 180 cm,
Temperatur 170°C, Gasdurchfluß
Stickstoff 40 ml/min.

Die mit einer Klammer versehenen Signale waren ebenfalls in einem Kontrollextrakt vorhanden.

Die elektronische Verstärkung lag bei Abbildung 1c um den Faktor 4 niedriger.

DCP = Dichlorphenol

TCP = Trichlorphenol

DCTP = Dichlorthiophenol

TCTP = Trichlorthiophenol

Tabelle 3: Initiale Ausscheidung von unveränderter Ausgangssubstanz über den Darm nach intraperitonealer Injektion von Hexachlorcyclohexanisomeren.

Hexachlorcyclohexaniso- mer appliziert (17,3 µMol)	Unverändert ausgeschieden in 3 Tagen (µMol)
alpha	0,50
beta	2,19
gamma ¹	0,32
delta	1,53

¹ Gamma-Hexachlorcyclohexan löste bei diesem Tier einen Erregungszustand aus. Das Tier nahm daher nur wenig Nahrung auf. Die Stuhlmenge war demzufolge wesentlich kleiner als bei den anderen Tieren (15 g in 3 Tagen; Durchschnitt der 3 anderen Tiere: 34 g Stuhl in 3 Tagen).

Parallel zum Urin wurden Extrakte aus dem Stuhl der Tiere untersucht. In diesen Extrakten wurden kleine Mengen (unter 5% der Menge im Urin) 2,4,6-Trichlorphenol neben unverändertem Hexachlorcyclohexan gefunden, dessen Menge nicht unbeträchtlich war (s. Tabelle 3). Bei beta-Hexachlorcyclohexan scheint die intestinale Ausscheidung der unveränderten Substanz sogar erheblich mehr zur Elimination beizutragen als die biochemische Umwandlung (vgl. hierzu auch Tabelle 4).

Das Resultat dieser Untersuchung deutete daraufhin, daß die Umformung zu 2,4,6-Trichlorphenol ein quantitativ sehr wesentlicher Weg in der Biotransformation der vier untersuchten Isomeren in der Ratte ist und für drei der Isomere, ausgenommen das beta-Isomere, gleichzeitig ein Weg, der zur Elimination aus dem Tier entscheidend beiträgt. Für alpha-Hexachlorcyclohexan ist das bereits belegt (KORANSKY u.a., 1975), und zwar für einen Zeitraum von vier Wochen; das sind etwa vier Halbwertszeiten der Substanz. Für die Isomeren beta- und delta-

wurde die renale Ausscheidung des symmetrischen Trichlorphenols über einen Zeitraum von zehn Tagen bestimmt.

1.2. Produktion von 2,4,6-Trichlorphenol aus beta- und delta-Hexachlorcyclohexan im Verlauf von zehn Tagen

Vier weibliche Ratten gleichen Körpergewichts erhielten beta- oder delta-Hexachlorcyclohexan in einer Dosis von 17,3 oder 173 μMol durch intraperitoneale Injektion. Der Urin der Tiere wurde täglich auf seinen Gehalt an 2,4,6-Trichlorphenol untersucht. Das Resultat ist in Tabelle 4 aufgeführt.

Die Produktion des symmetrischen Trichlorphenols aus beta-Hexachlorcyclohexan war nach beiden Dosen über den Versuchszeitraum nahezu stetig aber insgesamt um den Faktor 50 kleiner als aus delta-Hexachlorcyclohexan, bei dem die initiale Produktion wiederum einem erheblichen Anteil der Dosis entsprach, selbst wenn diese 173 $\mu\text{Mol} \hat{=} 300 \text{ mg/kg}$ entsprach.

1.3. Produktion von 2,4,6-Trichlorphenol aus delta-Pentachlorcyclohexen und 1,3,5-Trichlorbenzol

Die Isomeren beta- und delta-Hexachlorcyclohexan unterscheiden sich in ihrer Konfiguration nur an einer Stelle des Moleküls. An dieser Stelle ist eine Kohlenstoff-Chlor-Bindung bei dem beta-Isomeren äquatorial, bei dem delta-Isomeren axial orientiert (s. Abbildung 14). Beide Substanzen liefern bei der basenkatalysierten Abspaltung eines Mols Salzsäure das gleiche Produkt, delta-Pentachlorcyclohexen (HUGHES u.a., 1953). Die Aktivierungsenergie der Reaktion ist jedoch bei beta-Hexachlorcyclohexan um ca. 12 kcal/Mol größer als bei delta-Hexachlorcyclohexan (CRISTOL u.a., 1951). Dieser chemische Tatbestand könnte eine Erklärung für den biologischen Befund

Tabelle 4: Renale Ausscheidung von 2,4,6-Trichlorphenol nach intraoperitonealer Applikation von beta- und delta-Hexachlorcyclohexan

Tag	beta-Hexachlorcyclohexan		delta-Hexachlorcyclohexan	
	17,3 μ Mol	173 μ Mol	17,3 μ Mol	173 μ Mol
	2,4,6-Trichlorphenol ausgeschieden			
	(nMol)		(μ Mol)	
1	28	55,5	1,17	
2	22	122	1,5	55,5
3	22	111	2,22	22,2
4	28	166	2,11	13,9
5	28	388	1,33	13,9
6	22	250	1,39	5,0
7	22	333	0,8	2,5
8	22	360	0,78	2,2
9	22	166	0,72	
10	22	166	0,66	
Summe:	0,24 μ Mol	2,12 μ Mol	12,7 μ Mol	115,2 μ Mol

¹ Das Tier, das 173 μ Mol beta-Hexachlorcyclohexan erhalten hatte, nahm vom 5.Versuchstag kaum noch Futter zu sich. Es starb fünf Tage nach Beendigung des Versuchs.

bieten, daß die Umwandlung von beta-Hexachlorcyclohexan in 2,4,6-Trichlorphenol, verglichen mit dem delta-Isomeren, wesentlich langsamer erfolgt. Wenn delta-Pentachlorcyclohexen das gemeinsame Zwischenprodukt dieser Isomeren auf dem Weg zum symmetrischen Trichlorphenol wäre, könnte die Dehydrochlorierung des Hexachlorcyclohexan der geschwindigkeitsbestimmende Schritt sein. Um zu prüfen, ob diese Annahme den biologischen Sachverhalt richtig beschreibt, wurde die Bildung

von 2,4,6-Trichlorphenol aus delta-Pentachlorcyclohexen gemessen. Außerdem wurde 1,3,5-Trichlorbenzol untersucht. 1,3,5-Trichlorbenzol entsteht bei der alkalischen Dehydrochlorierung von Pentachlorcyclohexen in kleiner Menge (HUGHES u.a., 1953; MÜNSTER, 1975). Es ist das einzige Trichlorbenzolisomere, für das eine biologische Oxidation zu 2,4,6-Trichlorphenol in einem Säugetier beobachtet wurde (JONDORF u.a., 1955; PARKE und WILLIAMS, 1960).

Je zwei weibliche Ratten gleichen Körpergewichts erhielten 17,3 μ Mol delta-Pentachlorcyclohexen oder 1,3,5-Trichlorbenzol intraperitoneal injiziert. Ihr Urin wurde fünf Tage lang gesammelt und auf seinen Gehalt an 2,4,6-Trichlorphenol untersucht. Zur Dokumentation des Resultats dienen die Abbildungen 2a-c. Nach Applikation beider Substanzen schieden die Tiere 2,4,6-Trichlorphenol mit dem Urin aus; die Gesamtmenge lag jedoch nach delta-Pentachlorcyclohexen unter 1% der Dosis, bei 1,3,5-Trichlorbenzol betrug sie 10% der Dosis. Nach delta-Pentachlorcyclohexen waren vom dritten Tag an keine Metaboliten mehr in den Urinextrakten nachweisbar. Am ersten und zweiten Tag wurden hauptsächlich Dichlorthio-phenole und 2,4,5-/2,3,5-Trichlorphenol gefunden. Dies entspricht den Befunden von GROVER und SIMS (1965) über die Biotransformation von gamma-Pentachlorcyclohexen in Ratten. GROVER und SIMS (1965) wiesen 2,4-Dichlorphenylmercaptursäure und die Sulfate und Glucuronide der beiden genannten Trichlorphenolisomere als Metabolite dieses Pentachlorcyclohexenisomeren nach. Sie fanden kein 2,4,6-Trichlorphenol. Im Vergleich zum Pentachlorcyclohexen, bei dem etwa 90% der insgesamt erfaßten Metabolite in Urinproben des ersten Tages nach Applikation gefunden wurden, erfolgte die Ausscheidung von Metaboliten des 1,3,5-Trichlorbenzol langsamer. Noch am

Abbildung 2: Metabolite von Abbauprodukten von delta-Hexachlorcyclohexan im Rattenurin

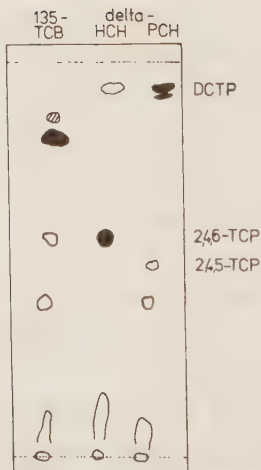
a)



b)



c)



Gaschromatogramme von Hexanextrakten aus alkalisch hydrolysiertem Urin (s. Methoden) nach Umsetzung mit Diazomethan nach Gabe von

a) delta-Pentachlorcyclohexan
b) 1,3,5-Trichlorbenzol

GC-Bedingungen: Detektor ECD gepackte Glassäule OV 1, 180 cm Temperatur 170°C, Gasdurchfluß Argon/Methan 30 ml/min.

c) Dünnschichtchromatogramm auf Kieselgel GF-254 nach Entwicklung mit Benzol und Registrierung der Flecken mit UV-Licht. Aufgetragen wurde der nicht-methylierte Extrakt (s. Methoden), der aus Urin von mit 1,3,5-Trichlorbenzol (links), delta-Hexachlorcyclohexan (Mitte) und delta-Pentachlorcyclohexan (rechts) vorbehandelten Tieren erhalten wurde.

TCP = Trichlorphenol
DCTP = Dichlorthiophenol

fünften Tag nach Applikation waren kleine Mengen im Urin der Tiere nachweisbar. JONDORF u.a. (1955) sowie PARKE und WILLIAMS (1960) hatten bereits eine langsame Elimination von 1,3,5-Trichlorbenzol durch Kaninchen beschrieben.

Die Extrakte aus Rattenurin enthielten mehrere unbekannte Substanzen. Von einer dieser Substanzen wurden Massenspektren erhalten, die sie als den Dimethyldäther eines Isomers des Dichlormonohydroxythiophenol ($M^+ = 222$) identifizierten (PORTIG, unveröffentlicht).

2. Nichtbiologische Umwandlung von Hexachlorcyclohexan in das symmetrische Trichlorphenol

Der Versuch von MEUNIER

Nach BEILSTEIN 1. Aufl., V, 23 werden beim Erhitzen einer wäßrigen Suspension von alpha-Hexachlorcyclohexan im Bombenrohr neben Salzsäure, Trichlorbenzolen und Brenzkatechin 2,4-Dichlorphenol und 2,4,6-Trichlorphenol erhalten. Die Originalarbeit (MEUNIER, 1887) enthält Belege für das Auftreten von Di- und Trichlorphenol, jedoch keinen Beleg für die Identität von Positionsisomeren. Die Angaben wurden experimentell überprüft, um festzustellen, ob es sich hier tatsächlich um eine chemische Modellreaktion für die exklusive Bildung des symmetrischen Trichlorphenols aus einem Hexachlorcyclohexanisomer handelt.

13,75 μMol ($\hat{=}$ 4 mg) alpha-Hexachlorcyclohexan wurden in einem Bombenrohr mit ca. 5 - 6 ml Inhalt mit 3 ml Wasser und Luft auf 200°C für vier Stunden erhitzt. Das Reaktionsgemisch enthielt wie bei MEUNIER Salzsäure und Trichlorbenzol sowie Di- und Trichlorphenol. Es handelte sich in beiden Fällen um Gemische isomerer Formen, in denen jedoch das 2,4-Isomere und das 2,4,6-Isomere den höchsten Anteil haben.

Tabelle 5: Bildung von Chlorphenolen aus alpha- und gamma-Hexachlorcyclohexan im Bombenrohr

Isomer	entstandenes Chlorphenol in nMol aus			
	alpha-	gamma-	alpha-	gamma-
	Hexachlorcyclohexan			
	Ansatz mit			
	Stickstoff		Sauerstoff	
2,6-DCP	209	345	96,5	294
2,5-DCP	51	511	30,5	408
2,4-DCP	797	972	653	754
3,4-DCP	86	206	103	206
2,4,6-TCP	0,5	0,5	87,5	87,5
2,3,6-TCP	0 ¹	0	3,5	6,5
2,4,5-/2,3,5-TCP	0	0	3,5	6,5
2,3,4-TCP	0	0	1,0	2,1

DCP = Dichlorphenol ; TCP = Trichlorphenol

¹Die untere Nachweisgrenze lag bei 50 pMol (≈ 10 ng) Trichlorphenol im Gesamtansatz. Die Anwesenheit von Tetrachlorphenol konnte nicht gesichert werden.

Tabelle 5 zeigt die Zusammensetzung des Gemisches, wenn statt Luft Sauerstoff oder Stickstoff benutzt wurde. Außerdem wurde das gamma-Isomere unter diesen Bedingungen untersucht. Bei beiden Isomeren wird das 2,4-Dichlorphenol und das 2,4,6-Trichlorphenol bevorzugt gebildet. Von besonderem Interesse ist aber, daß für die Bildung des Trichlorphenol die Anwesenheit von Sauerstoff nötig ist, denn dieses weist auf einen oxidativen Prozess hin.

Diese Feststellung veranlaßte die Suche nach einem oxidativen Schritt auch im biologischen Abbau von Hexachlorcyclohexan.

Versuche an Mikrosomen der Rattenleber

Der Vergleich der renalen Ausscheidung von 2,4,6-Trichlorphenol nach Applikation von Hexachlorcyclohexanisomeren hatte gezeigt, daß die Substanz am schnellsten aus dem delta-Isomeren gebildet wird. Deshalb wurde zunächst dieses Isomere eingesetzt, um zu prüfen, ob Hexachlorcyclohexan ein Substrat mikrosomaler Oxygenasen ist.

1. Bildung von 2,4,6-Trichlorphenol aus delta-Hexachlorcyclohexan

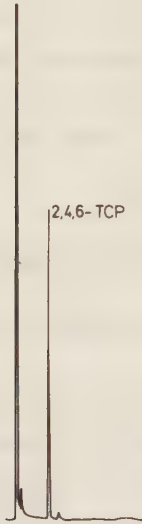
1.1. Nachweis der Identität des Produktes und Ausschluß der Bildung anderer Chlorphenole

Mit NADPH substituierte Mikrosomensuspensionen enthielten nach Inkubation mit delta-Hexachlorcyclohexan in Gegenwart von Luft 2,4,6-Trichlorphenol. Die Bildung des Chlorphenols blieb aus, wenn die Suspension zuvor 2 Minuten in ein kochendes Wasserbad gehalten worden war oder kein NADPH enthielt. Austausch der Luft gegen Stickstoff hatte den gleichen Effekt. Der Nachweis des Trichlorphenols erfolgte durch gaschromatographische Analyse von Extrakten, die die sauren, hexanextrahierbaren Bestandteile der Suspension enthielten (siehe methodischer Teil). Abbildung 3a zeigt eines der zahlreichen Chromatogramme, die erhalten wurden. Außer einer Substanz mit der Retentionszeit des 2,4,6-Trichlorphenol waren keine anderen Chlorphenole nachweisbar.

Extrakte aus mehreren Ansätzen wurden vereinigt, konzentriert und das Konzentrat mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie analysiert. Eines der Massenspektren, die registriert wurden, ist in Abbildung 3b wiedergegeben. Es zeigt das Fragmentierungsmuster eines Trichloranisols (Trichlorphenylmethyläther) und nicht eines Trichlorphenols, da die Extrakte für

Abbildung 3: Nachweis von 2,4,6-Trichlorphenol in Mikrosomen nach Inkubation mit delta-Hexachlorcyclohexan

a)



TCP = Trichlorphenol

a) Gaschromatogramm eines Hexan-extraktes, der aus Mikrosomen gewonnen wurde, die 15 Minuten mit delta-Hexachlorcyclohexan inkubiert waren. Der Extrakt enthielt nur saure Bestandteile und wurde methyliert.

GC-Bedingungen: Detektor ECD gepackte Glassäule OV 1, 180 cm Temperatur 170°C, Gasdurchfluß Argon/Methan 30 ml/min.

b) Massenspektrum von 2,4,6-Trichlorphenylmethyläther, das durch Inkubation von delta-Hexachlorcyclohexan mit Mikrosomen gewonnen wurde.

Ordinate: Intensität in Prozent
Abszisse: Masse/Elementarladung
wichtige Signale:

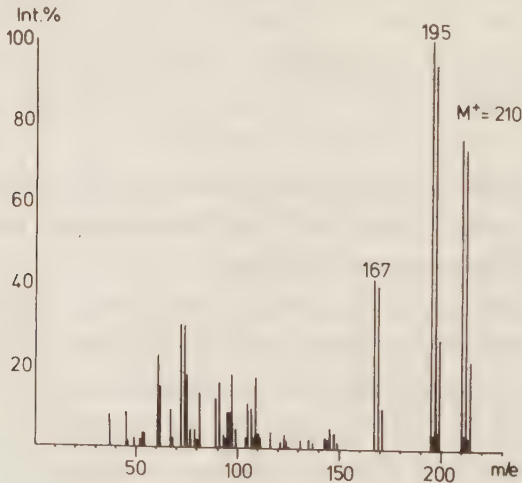
210 : M^+

195 : $M^+ - CH_3$

167 : $M^+ - CH_3 - CO$

97 : $M^+ - CH_3 - CO - 2 Cl$

b)



die gaschromatographische Analyse mit Diazomethan umgesetzt wurden. Die Tatsache, daß unter den Aufnahmebedingungen nicht das MolekÜlion sondern das Fragment $M^+ - 15$ die höchste Intensität aufweist, belegt zusätzlich zur Retentionszeit, daß es sich um das 2,4,6-Isomere handelt. Bei den anderen Isomeren ist das MolekÜlion Basispeak.

Der gaschromatographische Befund, daß neben 2,4,6-Trichlorphenol kein weiteres Chlorphenol entsteht, wurde durch Einsetzen von uniform mit ^{36}Cl markiertem delta-Hexachlorcyclohexan als Substrat überprüft. Das Resultat dieses Versuches ist in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Tabelle 6: ^{36}Cl -delta-Hexachlorcyclohexan als Substrat NADPH-substituierter Rattenlebermikrosomen

Inkubationsdauer (Minuten)	2,4,6-TCP ¹ (nMol)	^{36}Cl im Extrakt, der 2,4,6-TCP enthielt (Zpm)	
		gefunden	erwartet ²
2	4,36	1272	1220
5	6,94	1994	1810
5	7,55	2167	2060
5	6,39	1850	1760
5	7,39	2140	2030

¹ gaschromatographisch bestimmt. Mikrosomen aus 2,5 g Leber suspendiert in 7 ml Gesamtvolumen. 173 nMol delta-Hexachlorcyclohexan mit 1×10^5 Zpm ^{36}Cl in 1 µl Methanol. Lebern männlicher Tiere vorbehandelt mit Phenobarbital.

² berechnet aus der spezifischen Aktivität des eingesetzten Hexachlorcyclohexans und der gaschromatographisch ermittelten Menge 2,4,6-Trichlorphenol unter Berücksichtigung der Abspaltung von 3 Chloratomen.

Die spezifische Aktivität des entstandenen 2,4,6-Trichlorphenol stimmte mit dem erwarteten Betrag zufriedenstellend überein. Dies wäre nicht der Fall, wenn ein Teil des ^{36}Cl in dem analysierten Extrakt mit einer anderen Substanz verbunden wäre. In diesem Versuch wurden nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten 89% des eingesetzten Hexachlorcyclohexans und 97,5% des ^{36}Cl wiedergefunden, 88% assoziiert mit dem nicht umgesetzten Substrat.

3.1.2. Zeitlicher Verlauf der Bildung des 2,4,6-Trichlorphenols an Mikrosomen aus delta-Hexachlorcyclohexan

Der zeitliche Verlauf der Reaktion wurde wiederholt geprüft. 12 Reihen von Meßergebnissen (von nicht stimulierten männlichen und weiblichen sowie durch Phenobarbital oder delta-Hexachlorcyclohexan stimulierte weibliche Tiere) sind für Abbildung 4 verwendet worden. Es wurde festgestellt, daß die Reaktion über mindestens 20 Minuten linear verläuft. Alle im folgenden mitgeteilten Befunde basieren auf Versuchen, bei denen die Inkubationsdauer 15 Minuten betrug. Bei Versuchen mit mit Phenobarbital stimulierten männlichen Tieren wurde nur 5 Minuten inkubiert, da hier nur eine Linearität bis zu 10 Minuten festgestellt wurde.

3.1.3. Belege für die Beteiligung von Cytochrom P-450

Die folgenden Befunde belegen, daß an der Bildung des 2,4,6-Trichlorphenol aus delta-Hexachlorcyclohexan Cytochrom P-450 beteiligt ist.

a) Zusatz von delta-Hexachlorcyclohexan zu Mikrosomen erzeugt eine spektrale Veränderung im Bereich zwischen 350 - 450 nm (s. Abbildung 5). Eine ähnliche Veränderung wurde bereits von SCHULTE-HERRMANN u.a. (1974) mit dem alpha-Isomeren gefunden.

Abbildung 4: Bildung von 2,4,6-Trichlorphenol aus delta-Hexachlorcyclohexan an Mikrosomen in Abhängigkeit von der Zeit.
Für die Werte 5, 10, 15, 20, und 25 Minuten $n = 12$,
für 30 Minuten $n = 5$.

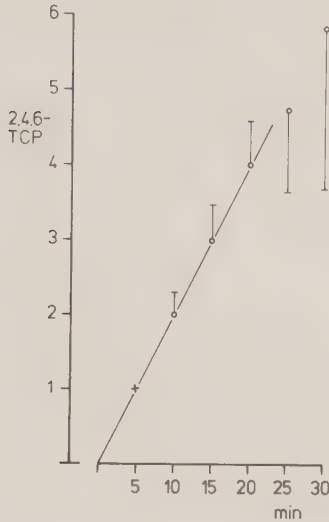
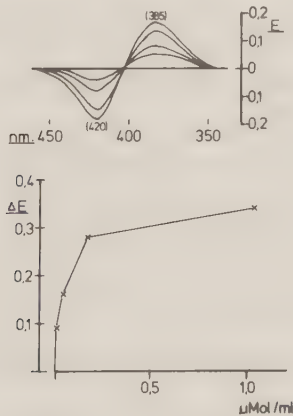


Abbildung 5: Differenzspektren von delta-Hexachlorcyclohexan an Mikrosomensuspensionen (oben)
Extinktionsdifferenz (385/420 nm) aufgetragen gegen
delta-Hexachlorcyclohexankonzentration (unten)



Ein Differenzspektrum, das in diesem Wellenlängenbereich registriert wird, wenn ein Substrat mikrosomaler Oxygenasen zu Mikrosomensuspensionen zugesetzt wird, wird als Folge einer Anlagerung der Substanz an das Hämoprotein interpretiert und deshalb auch als Bindungsspektrum der Substanz bezeichnet. Die Bindungsspektren verschiedener Substanzen sind nicht gleich. Sie lassen sich grob in zwei Gruppen unterteilen, bezeichnet als Typ I und Typ II, die sich, wenn sie typisch sind, nahezu wie Spiegelbilder voneinander unterscheiden.

Das Bindungsspektrum des delta-Hexachlorcyclohexan (Abbildung 5) hat ein Maximum bei 385 nm und ein Minimum bei 420 nm und ist dadurch als Bindungsspektrum vom Typ I klassifiziert.

b) Die Rate der Bildung von 2,4,6-Trichlorphenol ist an Lebermikrosomen weiblicher Tiere kleiner als an Präparationen männlicher Tiere. Letztere enthalten mehr Pigment als erstere.

Die Bildungsrate (pMol/g Leber/min) betrug bei pH 7,4 und Standardbedingungen an Mikrosomen weiblicher Tiere 179 ± 41 ($n = 20$), an Mikrosomen männlicher Tiere 906 ± 143 ($n = 10$).

c) Die Bildung von 2,4,6-Trichlorphenol erfolgt langsamer, wenn die Gasphase Kohlenmonoxid enthält. Anwesenheit von Kohlenmonoxid neben Sauerstoff in der Gasphase im Verhältnis 2 : 1 bzw. 4 : 1 senkte die Produktion an symmetrischen Trichlorphenol aus delta-Hexachlorcyclohexan auf $67,5 \pm 9,2\%$ ($n = 9$) bzw. auf $59,4 \pm 5,9\%$ ($n = 11$) der Menge, die in Parallelansätzen entstand, deren Gasphase Luft war.

d) 10^{-5} M Metyrapon senkte die Umsatzrate auf 50%, 10^{-3} M Metyrapon auf 15 - 20%.

e) Vorbehandlung der Tiere mit Phenobarbital erhöhte die Rate der 2,4,6-Trichlorphenolbildung sowohl bei weiblichen Tieren ($545,7 \pm 75,5$ pMol/g Leber/min; $n = 4$; $p < 0,001$ gegenüber nicht stimulierten Tieren) als auch bei männlichen Tieren (1503 ± 292 pMol/g Leber/min; $n = 4$; $p < 0,001$ gegenüber nicht stimulierten Tieren) signifikant.

f) Die Rate der 2,4,6-Trichlorphenolproduktion war nach einer Einzeldosis von 200 mg/kg delta-Hexachlorcyclohexan intra-peritoneal bei weiblichen Ratten sowohl nach 6 als auch nach 13 Tagen auf 175% gegenüber unbehandelten erhöht. Es war bekannt, daß Hexachlorcyclohexanisomere die Oxidation von Pharmaka durch Lebermikrosomen steigern (GHAZAL u.a., 1964; KORANSKY u.a., 1969). Der hier für das delta-Isomere erhobene Befund zeigt, daß dieser Effekt auch die Metabolisierung der Substanz selbst betrifft.

3.1.4. pH-Abhängigkeit der Reaktion

Die zur Prüfung der Abhängigkeit der Umsatzrate vom pH durchgeführten Untersuchungen sind in Tabelle 7 zusammengefaßt. Die Tabelle enthält außerdem einen zusätzlichen Beleg (Versuch 5 und 6) für den relativ langanhaltenden Effekt einer Vorbehandlung mit delta-Hexachlorcyclohexan selbst.

Die Zahlen zeigen ein um etwa eine pH-Einheit breites Optimum um den Neutralpunkt. Insbesondere wurde festgestellt, daß die Umsatzrate im leicht alkalischen Milieu signifikant niedriger ist als am Neutralpunkt.

3.1.5. Einfluß von Glutathion

KRAUS u.a. (1973) hatten mit radioaktiv markiertem alpha-Hexachlorcyclohexan als Substrat festgestellt, daß Mikrosomen der Rattenleber dieses Isomere transformieren, wenn sie entweder mit NADPH oder Glutathion substituiert sind. Die Transformationsprodukte wurden nicht identifiziert, aber radio-dünnschichtchromatographische Untersuchungen deuteten daraufhin, daß in einer GSH-abhängigen Reaktion Glutathionkonjugate gebildet wurden. Gleiche Befunde wurden auch mit gamma-Hexachlorcyclohexan erhoben (HOLZAPFEL, 1976).

Tabelle 7: Bildung von 2,4,6-Trichlorphenol (pMol/g Leber/min)
aus delta-Hexachlorcyclohexan an Mikrosomen bei
unterschiedlichem pH.

Tier	pH	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5
1			41	122	163	285	143	61	
2			61	125	196	197	140	84	
3		7	61	140	212	278	240	72	20
4		6	71	138	183	194	160	118	61
$\bar{x}$			57	131	188	238	171	84 ¹	
$\pm s$			± 12	± 9	± 22	± 50	± 46	± 25	
5 ²			153	398	410	538	398	201	
6 ²		22	130	340	418	382	390	227	230

¹ $p < 0,05$ für Differenz zu der Rate bei pH 7,0

² Tier 5 und 6 erhielten 14 Tage vor Versuch im Abstand von 3 Tagen 2 x 200 mg/kg delta-Hexachlorcyclohexan.

Um zu prüfen, inwieweit reduziertes Glutathion einen Einfluß auf die Bildung von 2,4,6-Trichlorphenol nimmt, wurde die Umsatzrate von delta-Hexachlorcyclohexan zu 2,4,6-Trichlorphenol an den Mikrosomen einer weiblichen Ratte mit und ohne GSH-Zusatz bestimmt. Sie betrug ohne GSH $239 \pm 28,5$ ($n = 4$) pMol/ 2,4,6-Trichlorphenol pro Mikrosomen aus 1 Gramm Leber pro Minute. Mit GSH lag sie bei 241 ± 29 pMol/g Leber/min, d.h. GSH hat auf die Bildung von 2,4,6-Trichlorphenol an Mikrosomen so gut wie keinen Einfluß.

3.2. Dehydrochlorierungsprodukte des delta-Hexachlorcyclohexan als Substrate

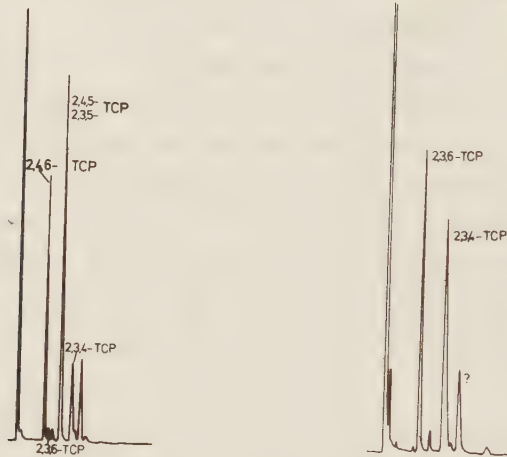
Die Abbildungen 6 a-d geben Chromatogramme wieder, die zeigen, welche Chlorphenole in Mikrosomensuspensionen enthalten sind, die bei pH 7,4 mit delta-Pentachlorcyclohexen oder isomeren Trichlorbenzolen inkubiert worden waren. Nur nach Inkubation mit 1,3,5-Trichlorbenzol war das symmetrische Trichlorphenol als einziges Chlorphenol nachweisbar. Aus delta-Pentachlorcyclohexen entstanden neben 2,4,6-Trichlorphenol noch die Isomeren 2,4,5-/2,3,5- und 2,3,4- und wahrscheinlich eine kleine Menge des 2,3,6-Isomeren. Ein ähnliches zusammengesetztes Chlorphenolgemisch wurde auch bei Inkubation von Mikrosomen mit gamma-Pentachlorcyclohexen gefunden (s. Abbildung 7b).

Demgegenüber wurde sowohl aus 1,2,3-Trichlorbenzol als auch aus 1,2,4-Trichlorbenzol relativ viel einer Substanz mit der Retentionszeit von 2,3,6-Trichlorphenol gebildet und außerdem das 2,3,4-Isomere. 1,2,4-Trichlorbenzol unterschied sich von 1,2,3-Trichlorbenzol durch die Bildung von 2,4,5-/2,3,5-Trichlorphenol und einer kleinen Menge des 2,4,6-Isomeren.

Die Art und Weise, wie die Produkte der Dehydrochlorierung von delta-Hexachlorcyclohexan, insbesondere das Zwischenprodukt delta-Pentachlorcyclohexen, an Mikrosomen umgesetzt werden, bedarf weiterer Erklärung. Es ist jedoch evident, daß sie nicht als Zwischenprodukte der Reaktion mit delta-Hexachlorcyclohexan als Substrat in Frage kommen, da diese Reaktion die exklusive Bildung des symmetrischen Trichlorphenols bewirkt.

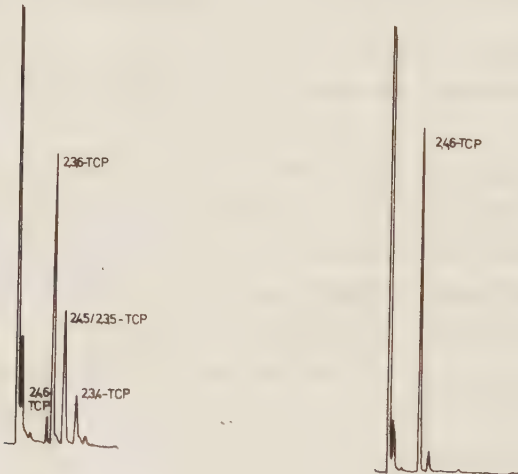
Abbildung 6: Chlorphenole in Mikrosomenextrakten nach Inkubation mit Dehydrochlorierungsprodukten von delta-Hexachlorcyclohexan

a) delta-Pentachlorcyclohexen b) 1,2,3-Trichlorbenzol



c) 1,2,4-Trichlorbenzol

d) 1,3,5-Trichlorbenzol



TCP = Trichlorphenol

Abbildung 6a: Gaschromatogramm eines Hexanextraktes, der aus Mikrosomen gewonnen wurde, die mit delta-Pentachlorcyclohexen inkubiert waren. Der Extrakt enthielt nur saure Bestandteile und war methyliert. GC-Bedingungen: Detektor ECD, gepackte Glassäule OV 1, 180 cm, Temperatur 170°C, Gasdurchfluß Argon/Methan 30 ml/min.

b: wie a mit 1,2,3-Trichlorbenzol
 c: wie a mit 1,2,4-Trichlorbenzol
 d: wie a mit 1,3,5-Trichlorbenzol

3.3. Produktion von 2,4,6-Trichlorphenol aus anderen Hexachlorcyclohexanisomeren

Vier Konfigurationsisomere des delta-Hexachlorcyclohexan wurden mit NADPH-substituierten Mikrosomen aus Rattenleber bei pH 7,4 und 37°C inkubiert. Nach einer Inkubationsdauer von 15 Minuten wurde in allen Ansätzen 2,4,6-Trichlorphenol gefunden. In Ansätzen, in denen alpha-, beta- oder epsilon-Hexachlorcyclohexan enthalten war, war wie beim delta-Isomeren außer 2,4,6-Trichlorphenol kein weiteres Chlorphenol nachweisbar. Bei epsilon-Hexachlorcyclohexan war die Menge, die entstand, etwa gleich groß wie die Menge, die unter gleichen Bedingungen aus dem delta-Isomeren gebildet wurde. Auch an den Mikrosomen einer weiblichen Ratte, an denen die Rate der 2,4,6-Trichlorphenolproduktion aus delta-Hexachlorcyclohexan mit $262,8 \pm 19,2$ pMol/g Leber/min ($n = 4$) relativ hoch war (vgl. Abschnitt 3.1.3.b), wurde für epsilon-Hexachlorcyclohexan als Substrat eine Rate etwa gleicher Größe, 253 und 270 pMol/g Leber/min gefunden. Die Bildungsraten für das symmetrische Trichlorphenol an Lebermikrosomen Phenobarbital-stimulierter Ratten ergaben folgende Rangordnung der Isomeren in relativen Zahlen (delta = 100 = 1306 pMol/g Leber/min):

alpha	beta	gamma	delta	epsilon
12	1,5	6,5	100	98

3.4. gamma-Hexachlorcyclohexan als Substrat

Wie unter Bedingungen in vivo (s.o., Abschnitt 1.1.) unterschied sich gamma-Hexachlorcyclohexan auch als Substrat der Mikrosomen von seinen Isomeren in qualitativer Hinsicht. Neben 2,4,6-Trichlorphenol war insbesondere ein Tetrachlorphenol nachweisbar, das die gleiche gaschromatographische Retentionszeit hatte wie das im Urin identifizierte 2,3,4,6-Tetrachlorphenol. Außerdem wurden in Extrakten weitere allerdings kleine Substanzpeaks registriert, die nach den Retentionszeiten Trichlorphenole sein könnten. Abbildung 7a zeigt ein typisches Chromatogramm. Gamma-Pentachlorcyclohexen, das Monodehydrochlorierungsprodukt des gamma-Hexachlorcyclohexan, wurde demgegenüber hauptsächlich (s. Abb. 7b) in 2,4,5-/2,3,5-Trichlorphenol umgeformt. Dies entsprach dem Befund, der für das delta-Isomere erhoben wurde (vgl. Abb. 6a). Im Unterschied zu diesem entstand jedoch in der Mehrzahl der Ansätze aus gamma-Pentachlorcyclohexen weniger 2,4,6-Trichlorphenol.

Die Bildung der beiden herausragenden Umsetzungsprodukte des gamma-Hexachlorcyclohexan wurde quantifiziert. Das Resultat aller Messungen ist in Tabelle 8 zusammengefaßt.

Abbildung 7a: Gaschromatogramm eines Hexanextrakts, der aus Mikrosomen gewonnen wurde, die mit gamma-Hexachlorcyclohexan inkubiert waren. Der Extrakt enthielt nur saure Bestandteile und war methyliert. GC-Bedingungen: Detektor ECD, gepackte Glassäule OV 1, 180 cm, Temperatur 170°C, Gasdurchfluß Argon/Methan 30 ml/min.
b: wie a mit gamma-Pentachlorcyclohexen

Abbildung 7: Chlorphenole in Mikrosomensuspensionen nach Inkubation mit gamma-Hexachlorcyclohexan und gamma-Pentachlorcyclohexen

a) gamma-Hexachlorcyclohexan b) gamma-Pentachlorcyclohexen

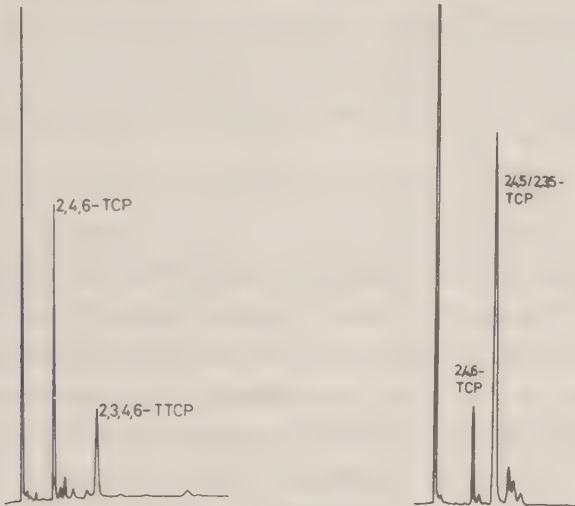


Tabelle 8: Bildung von 2,4,6-Trichlorphenol und 2,3,4,6-Tetrachlorphenol aus gamma-Hexachlorcyclohexan an Rattenlebermikrosomen (pMol/g Leber/min).

Lebermikrosomen aus				
	männlichen	weiblichen Ratten		
	Ratten	unbehandelt	mit Phenobarbital	mit 3-MC
2,4,6-TCP	21,8 ± 8,6	5,1 ± 1,1 ¹	21,7 ; 32,9	5,2 ; 5,6
2,3,4,6-TTCP	11,0 ± 3,9	6,7 ± 1,6	7,2 ; 6,0	4,6 ; 4,7
	(n = 4)	(n = 4)		

¹ p < 0,01 gegenüber Rate nach Phenobarbitalvorbehandlung

3-MC = 3-Methylcholanthren ; TCP = Trichlorphenol

TTCP = Tetrachlorphenol

DISKUSSION

1.2,4,6-Trichlorphenol als Metabolit von Hexachlorcyclohexan in der Ratte

Die hier vorgelegte Arbeit bestätigt den Befund von FREAL und CHADWICK (1973), daß in Ratten Hexachlorcyclohexan verschiedener Konfiguration in das symmetrische Trichlorphenol umgewandelt wird.

FREAL und CHADWICK (1973) hatten das aus saurem Urin mit Benzol extrahierbare Phenol gemessen. Die in der vorliegenden Arbeit angewandte Methode erfaßt auch den größten Teil des konjugiert vorhandenen Phenols. Mit einem ähnlichen Verfahren haben KORANSKY u.a. (1975) bereits gezeigt, daß 2,4,6-Trichlorphenol durchschnittlich 45% aller renalen Metabolite ausmacht, die Ratten aus dem alpha-Isomeren des Hexachlorcyclohexan im Verlauf von 4 Wochen ($\hat{=}$ 4 Halbwertszeiten) produzieren. Die Untersuchungen dieser Arbeit haben ergeben, daß 2,4,6-Trichlorphenol der Hauptmetabolit des delta-Isomeren in dieser Spezies ist, daß es ein wesentliches Stoffwechselprodukt des gamma-Isomeren darstellt, und daß es wahrscheinlich auch als das quantitativ bedeutsamste Produkt der Biotransformation von beta-Hexachlorcyclohexan zu gelten hat, für dessen insgesamt sehr langsame Elimination allerdings die intestinale Exkretion des unveränderten Moleküls entscheidender ist als die biochemische Umwandlung (vgl. Tab. 2 + 4).

2. Die biochemische Umwandlung von Hexachlorcyclohexan zu 2,4,6-Trichlorphenol

Das Resultat dieser Arbeit läßt den Schluß zu, daß das endoplasmatische Retikulum ein wesentlicher, wenn nicht der wichtigste Ort der biochemischen Umwandlung von Hexachlor-

cyclohexan zu 2,4,6-Trichlorphenol ist. Die an Mikrosomen in Gegenwart von NADPH und Sauerstoff erfolgende Reaktion wird durch Kohlenmonoxid und durch Metyrapon gehemmt. Daraus folgt, daß der Prozeß an die Aktivierung von molekularem Sauerstoff durch eine Spezies des Pigments Cytochrom P-450 gebunden ist. Es war die Frage zu entscheiden, ob die Übertragung des aktivierten Sauerstoffs vor oder nach Elimination von Salzsäure aus Hexachlorcyclohexan stattfindet.

2.1. Dehydrochlorierung von Hexachlorcyclohexan als initialer Schritt

Die Untersuchungen dieser Arbeit schließen aus, daß die Umwandlung von Hexachlorcyclohexan zu 2,4,6-Trichlorphenol mit Dehydrochlorierung beginnt.

Definitiv ausgeschlossen durch das Resultat der Versuche mit gamma- und delta-Pentachlorcyclohexen ist eine trans-1:2-Dehydrochlorierung von Hexachlorcyclohexan als erster Schritt. Zu erörtern bleibt die hypothetische Möglichkeit, die FREAL und CHADWICK (1973) postuliert haben, daß Hexachlorcyclohexan im Tier zunächst auf einem Haupttransformationsweg zum symmetrischen Trichlorbenzol umgeformt wird.

Diese Hypothese setzt voraus, daß auf der Stufe des Hexachlorcyclohexan oder eines Pentachlorcyclohexen Isomerisierungen der Art erfolgen, daß aus mehreren verschiedenen Konfigurationen dieser Moleküle eine Pentachlorcyclohexenkonfiguration resultiert, deren Dehydrochlorierung Überwiegend oder ausschließlich 1,3,5-Trichlorbenzol liefert. Gegen einen solchen Weg als reale Gegebenheit sprechen die folgenden Befunde aus dieser Untersuchung:

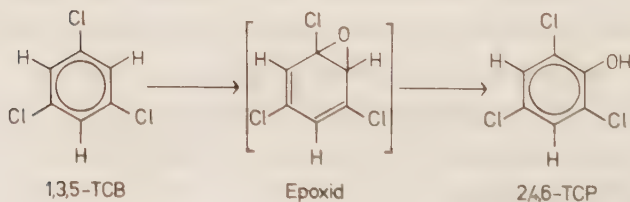
- a) Die Bildungsrate von 2,4,6-Trichlorphenol aus delta-Hexachlorcyclohexan an isolierten Lebermikrosomen nimmt signifikant ab, wenn der pH vom Neutralpunkt ins Alkalische

verschoben wird (vgl. Tab. 7). Dieser Befund spricht dagegen, daß Dehydrochlorierung von Hexachlorcyclohexan geschwindigkeitsbestimmend ist.

- b) Aus Pentachlorcyclohexen entsteht in vivo weniger als 1 Prozent 2,4,6-Trichlorphenol. Isomerisierungen auf der Stufe des Pentachlorcyclohexen sind demnach, wenn sie überhaupt erfolgen, sehr langsame Vorgänge.
- c) 1,3,5-Trichlorbenzol wird zwar an isolierten Mikrosomen anscheinend ausschließlich zu 2,4,6-Trichlorphenol oxidiert; in vivo ist das Metabolitenmuster (vgl. Abb. 2b) jedoch von dem der Hexachlorcyclohexanisomeren so verschieden, daß es als entscheidendes Zwischenprodukt auf dem Weg von Hexachlorcyclohexan zu 2,4,6-Trichlorphenol ausscheidet.

Der Nachweis der Bildung einer Dichlormonohydroxycaptursäure aus 1,3,5-Trichlorbenzol läßt die Vermutung zu, daß die biochemische Bildung des 2,4,6-Trichlorphenol aus diesem Trichlorbenzol das Resultat einer Epoxidation ist (s. Abb. 8).

Abbildung 8: Umwandlung von 1,3,5-Trichlorbenzol zu 2,4,6-Trichlorphenol in der Ratte (Hypothese).



Es bleibt zu prüfen, in welchem Umfang dieses Epoxid enzymatischer Hydratation unterliegt.

- d) Die Bildung von 2,4,6-Trichlorphenol aus delta-Hexachlorcyclohexan an Mikrosomen setzt mit einem hohen Grad an Wahrscheinlichkeit zum Zeitpunkt 0 mit einer Kinetik 0.Ordnung ein (s. Abb. 4). Dieser Befund spricht gegen das Vorliegen mehrerer, konsekutiver enzymatischer Reaktionen, deren letzte die Einführung von Sauerstoff ist.

2.2.Einführung von aktiviertem Sauerstoff als initialer Schritt

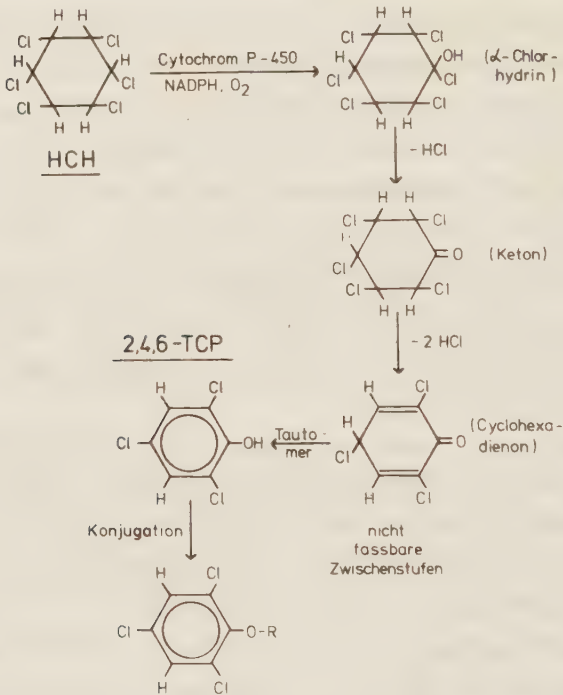
Die biochemischen Tatsachen sprechen somit dafür, daß die initiale Reaktion eine Oxidation von Hexachlorcyclohexan ist.

Die Oxidation von Hexachlorcyclohexan kann als Hydroxylierung oder als Dehydrogenierung erfolgen. Befunde von CHADWICK u.a. (1975) deuten daraufhin, daß Dehydrogenierung zwar möglich ist bei der Konfiguration gamma, aber unwahrscheinlich bei den Konfigurationen alpha, beta und delta.

Andererseits zeigte die Untersuchung der von MEUNIER beschriebenen Reaktion (s. Tab. 5), daß ein Angriff von thermisch aktiviertem Sauerstoff auf Hexachlorcyclohexan dessen Umwandlung in symmetrisches Trichlorphenol initiieren kann.

Diese Feststellungen lassen es zu, die direkte Hydroxylierung des Moleküls als reale Möglichkeit in Betracht zu ziehen. Die Hydroxylierung von Hexachlorcyclohexan wurde den in Abbildung 9 dargestellten Reaktionsablauf in Gang setzen. Das Hydroxylierungsprodukt ist ein alpha-Chlorhydrin. Alpha-Chlorhydrine sind instabil und spalten spontan Salzsäure ab. Abspaltung von Salzsäure aus diesem Chlorhydrin führt zu 2,3,4,5,6-Pentachlorcyclohexanon. Von den Protonen dieses Ketons sind die zwei in ortho-Stellung zur Ketogruppe, bedingt durch

Abbildung 9: Umwandlung von Hexachlorcyclohexan zu 2,4,6-Trichlorphenol in der Ratte (Hypothese)



deren Elektronegativität, saurer als die drei übrigen. Bei weiterer OH^- induzierter oder spontaner Abspaltung von Salzsäure werden daher diese Protonen zusammen mit den Chloratomen in meta-Stellung zur Ketogruppe bevorzugt abgespalten werden. Aus dieser Abspaltung resultiert ein 2,4,6-Trichlorcyclohexadienon, das tautomer zu 2,4,6-Trichlorphenol ist und sich sofort aromatisiert.

Diese Sequenz macht verständlich, weshalb bei der mikrosomalen Oxidation mancher Isomeren des Hexachlorcyclohexan ausschließlich 2,4,6-Trichlorphenol gefunden wird.

Die Bildung anderer Chlorphenole auf diesem Weg ist nahezu ausgeschlossen. Daher ist zu vermuten, daß die nicht-symmetrischen Trichlorphenole, die bei der mikrosomalen Oxidation von gamma-Hexachlorcyclohexan in kleiner Menge wahrscheinlich gebildet werden (Abb. 7a), auf eine andere Art und Weise entstehen.

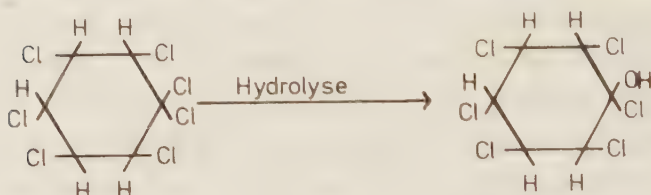
Es wurde für möglich gehalten, daß das Pentachlorcyclohexanon stabil und seine intermediäre Bildung indirekt nachweisbar sein könnte. Um das zu prüfen, wurden Mikrosomen mit delta-Hexachlorcyclohexan bei pH 5,5 inkubiert und geteilt; der eine Teil wurde direkt sauer extrahiert, der andere Teil wurde zunächst alkalischer Hydrolyse unterworfen (1 N NaOH, 100°C, 1 Stunde). Im heißen Alkali sollten möglicherweise vorhandene, stabile Zwischenprodukte zum Trichlorphenol abgebaut werden und eine Vermehrung der Menge an 2,4,6-Trichlorphenol im alkalisch hydrolysiertem Ansatz bewirken. Dies war jedoch nicht der Fall ($n = 5$). Offenbar sind alle Zwischenprodukte auf dem Weg von Hexachlorcyclohexan zu 2,4,6-Trichlorphenol in Mikrosomensuspensionen auch bei pH 5,5 instabil.

Parallel zu diesen Experimenten mit Mikrosomenpräparaten wurde alpha-Heptachlorcyclohexan im Bombenrohr bei 200°C in 0,1 N HCl hydrolysiert in der Erwartung, daß eines der geminalen Chloratome bevorzugt angegriffen (s. Abb. 10) und somit über ein alpha-Chlorhydrin das 2,3,4,5,6-Pentachlorcyclohexanon gebildet würde. Tabelle 9 zeigt, daß das wahrscheinlich tatsächlich der Fall war, denn das während der Hydrolyse gebildete Trichlorphenolgemisch enthielt über 50% 2,4,6-Trichlorphenol. Auch unter diesen Bedingungen war jedoch die Existenz nicht-aromatischer Vorstufen oder Zwischenprodukte nicht nachweisbar. Nach Kochen des Hydrolyseprodukts

Tabelle 9: Bildung von Trichlorphenolen durch Hydrolyse von 30 mg alpha-Heptachlorcyclohexan

Trichlorphenol	2,4,6	2,3,6	2,4,5/2,3,5	2,3,4
Menge in mg	6,0	2,9	1,5	1,0

Abbildung 10: Hydrolyse von alpha-Heptachlorcyclohexan zu 2,4,6-Trichlorphenol (Primärschritt)



in Alkali war die Menge Trichlorphenol, die isoliert wurde, nicht größer als in dem Teil des Ansatzes, der direkt sauer extrahiert wurde.

Diese Befunde lassen die Vermutung zulässig erscheinen, daß für die biochemische Bildung von 2,4,6-Trichlorphenol aus Hexachlorcyclohexan wahrscheinlich nur die Aktivierung des Sauerstoffs und seine Einführung in Hexachlorcyclohexan der Katalyse durch Enzym bedürfen.

2.3. Der Angriffsort des Sauerstoffs

Die Rate der Umwandlung von Hexachlorcyclohexan in 2,4,6-Trichlorphenol wies in vivo wie in vitro erhebliche Unterschiede auf in Abhängigkeit von der Konfiguration. Im lebenden Tier wie bei der Untersuchung an Lebermikrosomen wurde

folgende Reihenfolge $\delta > \alpha \leq \gamma > \beta$ gefunden. Es lag nahe, diese Reihenfolge auf die unterschiedliche Löslichkeit in Wasser und organischen Lösungsmitteln (ULMANN, Lindane, 1972) und damit auf Unterschiede in der Beweglichkeit in der Mikrosomensuspension und im Tierkörper zurückzuführen. Dabei ergeben sich jedoch keine befriedigenden Übereinstimmungen, denn

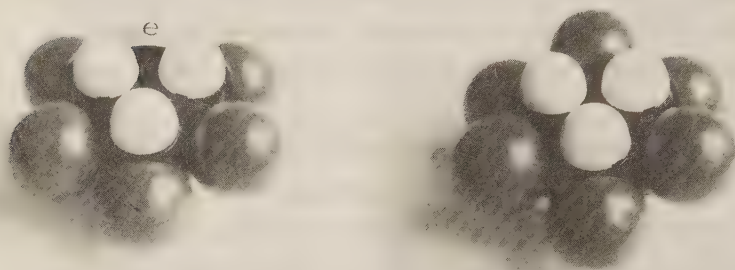
- a) gamma-Hexachlorcyclohexan ist in allen Lösungsmitteln erheblich besser löslich als das alpha-Isomere
- b) der Unterschied in der Löslichkeit zwischen beta- und delta-Hexachlorcyclohexan ist in keinem Lösungsmittel so groß wie der Unterschied in der Umsatzrate (100 : 1,5)
- c) die Beweglichkeit des beta-Isomeren kann angesichts der Größe der intestinalen Ausscheidung im Tierkörper nicht um den Faktor 60 - 70 geringer veranschlagt werden als die Beweglichkeit des delta-Isomeren.

Deshalb wurde geprüft, ob unterschiedliche sterische Behinderung der Einführung des Sauerstoffs die Unterschiede in der Umsatzrate erklären könnten.

Zwischen beta- und delta-Hexachlorcyclohexan besteht der größte Unterschied in der Reaktionsgeschwindigkeit, aber nur der Unterschied in der Stellung eines Wasserstoffatoms, das bei dem delta-Isomeren äquatorial und nicht axial angeordnet ist (s. Abb. 11). Zieht man diesen Unterschied als Ursache für die hohe Differenz in Betracht, dann muß man erklären, warum die Reaktion bei dem alpha- bzw. bei dem gamma-Isomeren langsamer abläuft als bei dem delta-Isomeren, obwohl diese zwei (alpha) bzw. sogar drei (gamma) äquatoriale Wasserstoffe besitzen.

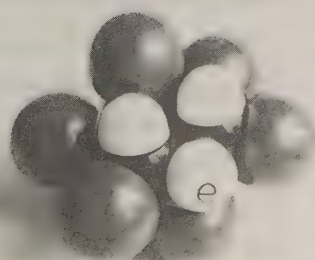
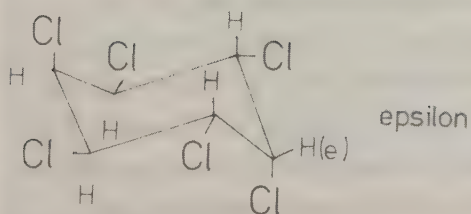
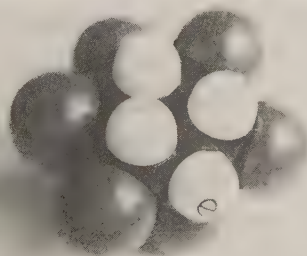
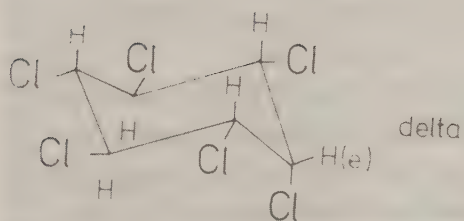
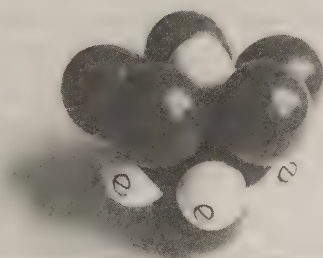
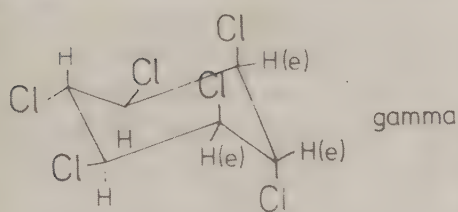
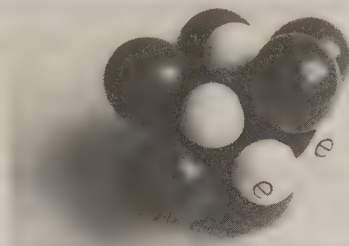
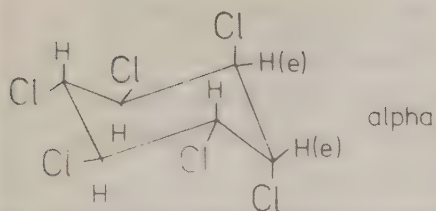
Betrachtet man sich die Moleküle in räumlicher Anordnung an Hand von Kalottenmodellen (s. Abb. 11 und 12), so kann man

Abbildung 11: Kalottenmodelle von beta- und delta-Hexachlorcyclohexan (e = äquatorialer Wasserstoff bei delta)



erkennen, daß das beta-Isomere durch die Chloratome gleichartig gegen den Angriff eines Sauerstoffs auf eine der sechs Kohlenstoff-Wasserstoff-Bindungen abgeschirmt ist. Delta-Hexachlorcyclohexan bietet demgegenüber "viel Platz" für einen derartigen Angriff, weil es ein äquatoriales Wasserstoffatom besitzt. Bei den Isomeren alpha und gamma ist dieser Angriffsort durch ein zweites bzw. ein zweites und ein drittes axiales Chloratom wieder behindert. Das epsilon-Isomere hat dagegen an diesem Angriffspunkt die gleiche räumliche Anordnung wie das delta-Isomere, besitzt aber im Verhältnis zu diesem eine wesentlich geringere Löslichkeit (Größenordnung von alpha-Hexachlorcyclohexan). Deshalb wurde dieses Isomere mit Mikrosomen inkubiert. Dabei zeigte sich (s. Tab. Abschnitt 3.3.), daß dieses Isomere eine nahezu gleich große Umsatzrate selektiv zu 2,4,6-Trichlorphenol besitzt wie das delta-Isomere. Dieser Befund legt die Vermutung nahe, daß der oxidative Angriff bevorzugt an der Stelle des Moleküls erfolgt, an der eine Kohlenstoff-Wasserstoff-Bindung äquatorial orientiert ist.

Abbildung 12: Kalottenmodelle von Hexachlorcyclohexanisomeren



3. Der Abbau des gamma-Hexachlorcyclohexan zu 2,4,6-Trichlorphenol und 2,3,4,6-Tetrachlorphenol

Das gamma-Isomere zeigt bei dem Abbau an Mikrosomen als einziges der fünf untersuchten Isomeren einen qualitativen Unterschied. Außer 2,4,6-Trichlorphenol tritt neben anderen Trichlorphenolen, die quantitativ nicht sehr ins Gewicht fallen, ein Tetrachlorphenol auf (s. Abb. 7a).

Zwei Befunde der vorliegenden Arbeit sprechen eindeutig dagegen, daß die Bildung der beiden Chlorphenole aneinander gekoppelt ist.

- a) Vergleichende Untersuchungen mit Mikrosomen aus Lebern männlicher und weiblicher Tiere, sowie nach Vorbehandlung mit Phenobarbital oder 3-Methylcholanthren zeigen, daß die Bildungsrate des Tetrachlorphenol zwischen nicht stimulierten und stimulierten weiblichen Ratten recht konstant ist, während die Induktion mit Phenobarbital zu einem signifikanten Anstieg der Bildungsrate des 2,4,6-Trichlorphenol führt.
- b) Bei der Umsetzung von gamma-Hexachlorcyclohexan im Bombenrohr ist der Anteil des Tetrachlorphenol - wenn überhaupt vorhanden - nur sehr klein.

CHADWICK u.a. haben 1975 gezeigt, daß gamma-Hexachlorcyclohexan an Mikrosomen zu Hexachlorcyclohexen dehydrogeniert werden kann. Sie konnten ebenfalls zeigen, daß dieses Produkt an Mikrosomen weiter umgesetzt wird. Als phenolische Endprodukte dieser Substanz konnten sie unter anderem 2,4,6-Trichlorphenol und 2,3,4,6-Tetrachlorphenol identifizieren, jedoch lag der Anteil des Trichlorphenol wesentlich niedriger als der Anteil des Tetrachlorphenol. Diese Befunde legen die Vermutung nahe, daß bei dem Abbau von gamma-Hexachlorcyclohexan das Tetrachlorphenol sowie ein kleiner Anteil des 2,4,6-Trichlorphenol über diesen Weg der Dehydrogenierung entstehen, während der größte Anteil des 2,4,6-Trichlorphenol sowie der durch Phenobarbital stimulierbare Anteil durch die direkte Hydroxylierung des Moleküls gebildet wird.

LITERATURVERZEICHNIS

- ABBOTT, D.C., COLLINS, C.B., GOULDING, R.: Organochlorine pesticide residues in human fat in the United Kingdom 1969 - 71, Brit. Med. J. 2, 553 - 556 (1972)
- BEILSTEIN's Handbuch der organischen Chemie, 1. Aufl. V, S. 23 (1922)
- CZEGLEDI-JANKO, G.: Gas-liquid chromatographic determination of alpha-, beta-, gamma- and delta-BHC levels in human blood, depot fat and various organs with the use of 2,2-dimethyl-propane-1,3-diol succinate as the stationary liquid phase. Analyst 98, 863 - 872 (1973)
- CHADWICK, R.W., CHUANG, L.T., WILLIAMS, K.: Dehydrogenation: A previously unreported pathway of lindane metabolism in mammals. Pesticide Biochem. Physiol. 5, 575 - 586 (1975)
- CHADWICK, R.W., FREAL, J.J.: The identification of five unreported lindane metabolites recovered from rat urine. Bull. environm. Contamin. Toxicol. 7, 137 - 146 (1972)
- CRISTOL, S.J., HAUSE, N.L., MEEK, J.S.: Mechanisms of elimination reactions: III. The kinetics of the alkaline dehydrochlorination of the benzene hexachloride isomers, II. J. Amer. Chem. Soc. 73, 674 - 679 (1951)
- DE BOER, Th.J., BACKER, H.J.: Diazomethane. Organic Syntheses 36, 16 - 19 (1956)
- ESTABROOK, R.W., FRANKLIN, M.R., HILDEBRANDT, A.G.: Factors influencing the inhibitory effect of carbon monoxide on Cytochrom P-450 catalyzed mixed function oxidation reactions. Ann. Mex York Acad. Sci. 174, 218 - 232 (1970)
- FREAL, J.J., CHADWICK, R.W.: Metabolism of hexachlorocyclohexane to chlorophenols and effect of isomer pretreatment on lindane metabolism in rat. J. Agr. Food Chem. 21, 424 - 427 (1973)

- FRICKE, G.: 1,3,4,5,6-Pentachlorcyclohexen-1 vom Schmelzpunkt 36,5 - 36,8°C. J. prakt. Chemie 4. Reihe Band 3, 304 - 305 (1956)
- GHAZAL, A., KORANSKY, W., PORTIG, J., VOHLAND, H.W., KLEMPAU, I.: Beschleunigung von Entgiftungsreaktionen durch verschiedene Insektizide. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol. 249, 1 - 10 (1964)
- GROVER, P.C., SIMS, R.: The metabolism of gamma-2,3,4,5,6-pentachlorocyclohex-1-ene and gamma-hexachlorocyclohexane in rats. Biochem. J. 96, 521 - 525 (1965)
- GRUNDEY, U., KRAUS, P.: The separation of labelled isomers of hexachlorocyclohexane by preparative thin layer chromatography. J. Chromat. 117, 242 - 244 (1976)
- HOLZAPFEL, G.: Über den in vitro Abbau des Insektizids gamma-Hexachlorcyclohexan in verschiedenen Organen der Ratte. Diss., Fachbereich Humanmedizin, Marburg 1976
- HUGHES, E.D., INGOLD, C.K., PASTERNAK, R.: Mechanism of elimination reactions. Part XVIII. Kinetics and steric course of elimination from isomeric benzene hexachlorides. J. Chem. Soc. (London) p.3832 - 3839 (1953)
- JONDORF, W.R., PARKE, D.V., WILLIAMS, R.T.: Studies in detoxication. 66. The metabolism of halogenobenzenes: 1,2,3-, 1,2,4- and 1,3,5-trichlorobenzenes Biochem. J. 61, 512 - 521 (1955)
- KARAPALLY, J.C., SAHA, J.G., LEE, Y.W.: Metabolism of lindane ¹⁴C in the rabbit: Ether soluble urinary metabolites. J. Agr. Food Chem. 21, 811 - 818 (1973)
- KOLKA, A.J., ORLOFF, H.D., GRIFFING, M.E.: The partial additive chlorination of the benzene ring. III. Pentachlorocyclohexene and hexachlorocyclohexene. J. Amer. Chem. Soc. 76, 1244 - 1249 (1954)

- KORANSKY, W., MAGOUR, S., NOACK, G., SCHULTE HERMANN, R.: Über den Einfluß induzierender Substanzen auf Fremdstoff-Oxydasen und andere Redoxsysteme der Leber. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol. 263, 281 - 292 (1969)
- KORANSKY, W., MÜNCH, G., NOACK, G., PORTIG, J., SODOMANN, S., WIRSCHING, M.: Biodegradation of alpha-hexachlorocyclohexane. V. Characterization of the major urinary metabolites. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol. 288, 65 - 78 (1975)
- KORANSKY, W., PORTIG, J.: Der Stoffwechsel der Hexachlorcyclohexan-Isomeren und seine Beeinflussung durch Mikrosomen aktivierende Pharmaka. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol. 243, 294 - 295 (1962)
- KORANSKY, W., PORTIG, J., VOHLAND, H.W., KLEMPAU, I.: Die Elimination von alpha- und gamma-Hexachlorcyclohexan und ihre Beeinflussung durch Enzyme der Lebermikrosomen. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol. 247, 49 - 60 (1964)
- KURIHARA, N., NAKAJIMA, M.: Studies on BHC isomers and related compounds. VIII. Urinary metabolites produced from gamma- and beta-BHC in the mouse: Chlorophenols conjugates. Pesticide Biochem. Physiol. 4, 220 - 231 (1974)
- LA CLAIR, J.B.: Determination of the gamma-isomer of hexachlorocyclohexane. Anal. Chem. 20, 241 - 245 (1948)
- MEUNIER, J.: Hexachlorures et hexabromures de benzine. Ann. Chim. Phys. 10, 260 - 269 (1887)
- MÜNSTER, J.: Zum chemischen und biologischen Verhalten von alpha-1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan und seinem Monodehydrochlorierungsprodukt beta-Pentachlorcyclohexen. Diss., Fachbereich Humanmedizin Marburg 1974
- NAKAJIMA, M., OKUBO, T., KATUMURA, Y.: The alkaline dehydrochlorination of the benzene hexachloride isomers, I. Botyu-Kagaku 14, 10 - 19 (1949)

- NOACK, G., PORTIG, J., WIRSCHING, M.: Biodegradation of alpha-hexachlorocyclohexane. IV. The extent of degradation of single doses in vivo. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol. 288, 57 - 64 (1975)
- PARKE, D.V., WILLIAMS, R.T.: Studies in detoxication: 81. The metabolism of hexachlorobenzenes. a) Penta- and hexachlorobenzenes b) further observations on 1,3,5-trichlorobenzenes. Biochem. J. 74, 5 - 9 (1960)
- RAMSEY, L.L., PATTERSON, W.J.: Separation and purification of some constituents of commercial hexachlorocyclohexane. J. Ass. Off. Agric. Chem. 29, 337 - 346 (1946)
- RIEMSCHEIDER, R.: Heptachlorcyclohexane I. Z. Naturforsch. 6b, 413 - 417 (1951)
- RIEMSCHEIDER, R., KARL, H., BÖS, R.: Zur Chemie von Polychlorcyclohexanen. Mitt. XX: Heptachlorcyclohexane III. Ann. 580, 191 - 197 (1953)
- SCHULTE HERMANN, R., LEBERL, C., LANDGRAF, H., KORANSKY, W.: Liver growth and mixed-function oxidase activity: Dose dependent stimulatory and inhibitory effects of alpha-hexachlorocyclohexane. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol. 285, 355 - 366 (1974)
- SEIBL, J.: Massenspektrometrie. Akademische Verlagsgesellschaft, Ffm (1970) S. 168
- SODOMANN, S.: Die Umwandlung von alpha-Hexachlorcyclohexan in Isomere des Dichlorphenylglutathion durch die Cytosol-Fraktion der Rattenleber. Diss., Fachbereich Humanmedizin, Marburg 1975
- STIJVE, T., CARDINALE, E.: On the residues associated with the use of technical grade BHC with special reference to the occurrence and determination of three pentachlorocyclohex-1-ene isomers. Mitt. Lebensmittelunters. Hyg. 63, 142 - 152 (1972)

ULMANN, E. (Herausg.): Lindane, Verlag K. Schillinger,
Freiburg i. Breisgau (1972), S. 16

VAN DER LINDEN, T.: Über die Benzolhexachloride und ihren
Zerfall in Trichlorbenzole. Ber. 45, 231 - 247
(1912)

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang KORANSKY, der es mir ermöglichte, die vorliegende Untersuchung in seinem Institut durchzuführen.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Joachim PORTIG bedanken. Durch seine hilfreiche und wohlwollende Unterstützung und durch viele wertvolle Anregungen und Ratschläge hat er entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Dr. Klaus STEINBACH danke ich für seine Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei einigen Experimenten.

Frau Gisela NOACK und Herrn Bernhard GROSS gilt mein Dank für ihre wertvolle technische Hilfe bei der Durchführung der beschriebenen Experimente.

LEBENS LAUF

- 28.3.1950 Geboren in Diez/Lahn als Sohn
des Apothekerehepaares Fritz und
Marie Stein geb. Schröder
- 1956-1958 Besuch der Volksschule in Ober-
lahnstein
- 1958-1960 Besuch der Volksschule in Diez/Lahn
- 1960-1968 Besuch des Gymnasiums in Limburg
- 19.6.1968 Reifeprüfung
- 1968-1970 Praktikantenzeit in der Amts-
Apotheke in Limburg
- 25.6.1970 Pharmazeutische Vorprüfung in
Wiesbaden
- 1970-1973 Studium der Pharmazie an der
PHILIPPS-Universität Marburg
- 5.10.1973 Staatsexamen
- 26.11.1973 Approbation als Apotheker
- Dezember 1973 Beginn der vorliegenden Dissertation
am Institut für Toxikologie und
Pharmakologie der PHILIPPS-Universität
Marburg unter Leitung von Herrn Prof.
Dr. med. Joachim PORTIG

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren:

Amon, Aziz, Böhme, Braasch, Dimroth, Ebel, Eger, Fruhstorfer,
Gallwitz, Haake, Haberich, Hartke, Hensel, Ihm, Karlson,
Kating, Koransky, Krieglstein, List, Otto, Petry, Portig,
Priebe, Schiff, Schmid, Schmitz, Schneider, Seitz, Unterhalt,
Vogel, Walcher, Wendt, Wesemann.

